TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

ENGLISH p. 3
A Rapid Membrane Enzyme Immunoassay for the Simultaneous Detection of *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase Antigen and Toxins A and B in Fecal Specimens
Catalog No. T30525C (25 Tests) or T30550C (50 Tests)
For Canadian Users: For Laboratory Use Only

ESPAÑOL pág. 9
Inmunoensayo enzimático rápido de membrana para la detección simultánea del antígeno glutamato deshidrogenasa de *Clostridium difficile* y de toxinas A y B en muestras fecales
N.º de catálogo T30525C (25 ensayos) o T30550C (50 ensayos)

DEUTSCH s. 15
Ein Membranenzymimmunoassay-Schnelltest für den gleichzeitigen Nachweis des *Clostridium difficile*-Antigens Glutamatdehydrogenase sowie Toxin A und B in Stuhlproben
Katalog-Nr. T30525C (25 Tests) bzw. T30550C (50 Tests)

FRANCAISE p. 21
Dosage immunoenzymatique membranaire rapide pour la détection simultanée de l'antigène glutamate déshydrogénase *Clostridium difficile* et des toxines A et B dans les échantillons de selles
Numéro de Catalogue T30525C (25 Tests) ou T30550C (50 Tests)
Pour les utilisateurs canadiens: Pour usage en laboratoire seulement

ČEŠTINA str. 27
Rychlá membránová enzymová imunoanalýza pro současnou detekci antigenu glutamát dehydrogenázy a toxinů A a B Clostridium difficile ve vzorcích stolice
Katalogové číslo T30525C (25 testy) nebo T30550C (50 testů)

DANSK s. 33
En hurtig membran-enzym-immunassay til samtidig påvisning af *Clostridium difficile*-antigenet glutamatdehydrogenase samt toksin A og B i fæcesprøver
Katalog nr. T30525C (25 test) eller T30550C (50 test)

ΕΛΛΗΝΙΚΑ σελ. 39
Μια ταχεία ανάλυση ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού σε μεμβράνη για την ταυτόχρονη ανίχνευση του αντιγόνου «γλουταμικής δεσυδρογονάσης» του *Clostridium difficile* και των τοξινών Α και Β σε δείγματα κοπράνων
Αρ. καταλόγου T30525C (25 αναλύσεις) ή T30550C (50 αναλύσεις)

MAGYAR 45. o.
Gyors membrán enzim immunoassay a *Clostridium difficile* glutamát-dehidrogenáz antigén, valamint az A és a B toxin egyidejű kimutatásra székletmintákban
Katalógussz.: T30525C (25 teszt) vagy T30550C (50 teszt)

ITALIANO p. 51
Un dosaggio immunoenzimatico rapido a membra per il rilevamento simultaneo dell'antigene glutammato deidrogenasi e delle tossine A e B di *Clostridium difficile* in campioni fecali
N. di catalogo T30525C (25 test) o T30550C (50 test)

NEDERLANDS p. 57
Een snel membraanenzymimmuno-assay voor de gelijktijdige detectie van *Clostridium difficile*-glutamaatdehydrogenase-antigen en de toxinen A en B in fecale monsters
Catalogusnr. T30525C (25 testen) of T30550C (50 testen)

NORSK s. 63
En hurtig membranenzymimmunanalyse for samtidig påvisning av *Clostridium difficile* glutamatdehydrogenase-antigen og toksin A og B i avføringsprøver
Katalognr. T30525C (25 tester) eller T30550C (50 tester)

SVENSKA sid. 69
En snabb immunoanalys av membranenzym för samtidigt påvisande av *Clostridium difficile*glutamatdehydrogenasantigen och toxinerna A och B i feacesprover
Katalognr. T30525C (25 tester) eller T30550C (50 tester)

TÜRKÇE syf. 75
Clostridium difficile Glutamat Dehidrojenazı Antijeni ile A ve B Toksinleri Saptaması için Hızlı Bir Membran Enzimi Bağışıklık Testi
Katalog No. T30525C (25 Test) ya da T30550C (50 Test)

РУССКИЙ с. 81
Мембранный иммуноферментный экспресс-анализ для одновременного обнаружения антигенов глутаматдегидрогеназы и токсинов А и В *Clostridium difficile* в пробах фекалий
№ по каталогу: T30525C (25 тестов) или T30550C (50 тестов)

PORTUGUÊS p. 87
Um Ensaio Imunoenzimático Rápido de Membrana para a Deteção Simultânea de *Clostridium difficile*, Antígeno glutamato desidrogenase e Toxinas A e B em Amostras Fecais Specimens
Catálogo N.º T30525C (25 Testes) ou T30550C (50 Testes)

U. S. Patent #8,343,726

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

INTENDED USE

The TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* test is a rapid membrane enzyme immunoassay for the simultaneous detection of *Clostridium difficile* glutamate dehydrogenase antigen and toxins A and B in a single reaction well. The test detects *C. difficile* antigen, glutamate dehydrogenase, as a screen for the presence of *C. difficile* and confirms the presence of toxigenic *C. difficile* by detecting toxins A and B in fecal specimens from persons suspected of having *C. difficile* disease. The test is to be used as an aid in the diagnosis of *C. difficile* disease. As with other *C. difficile* tests, results should be considered in conjunction with the patient history.

EXPLANATION

After treatment with antibiotics, many patients develop gastrointestinal problems ranging from mild diarrhea to severe pseudomembranous colitis. Many cases of the milder forms of gastrointestinal illness and most cases of pseudomembranous colitis are caused by toxigenic strains of *Clostridium difficile* (1). This organism is an opportunistic anaerobic bacterium that grows in the intestine once the normal flora has been altered by the antibiotic. Toxigenic strains of *C. difficile* carry the genes encoding the toxins while non-toxigenic strains do not carry the toxin genes. Disease onset is associated with the toxins that are produced by the toxigenic organism. The clinical symptoms associated with the disease are believed to be primarily due to toxin A, which is a tissue-damaging enterotoxin (2,3). *C. difficile* also produces a second toxin, designated toxin B. Toxin B, which has been referred to as the cytotoxin of the organism, is the toxin detected by the tissue culture assay currently used by many laboratories. Toxigenic *C. difficile* strains produce both toxins, or only toxin B (4-7). The glutamate dehydrogenase of *C. difficile* is a good antigen marker for the organism in feces because it is produced in high amounts by all strains, toxigenic or non-toxigenic (8-10). The antigen can be detected in fecal specimens by using the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* test. 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 B confirms the presence of toxigenic *C. difficile*.

PRINCIPLE OF THE TEST

The *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* test uses antibodies specific for glutamate dehydrogenase and toxins A and B of *C. difficile*. The device contains a *Reaction Window* with three vertical lines of immobilized antibodies. The antigen test line (“Ag”) contains antibodies against *C. difficile* glutamate dehydrogenase. The control line (“C”) is a dotted line that contains anti-horseradish peroxidase (HRP) antibodies. The toxins A and B test line (“Tox”) contains antibodies against *C. difficile* toxins A and B. The *Conjugate* consists of antibodies to glutamate dehydrogenase and antibodies to toxins A and B coupled to horseradish peroxidase. To perform the test, the sample is added to a tube containing a mixture of *Diluent* and *Conjugate*. The diluted sample-conjugate mixture is added to the *Sample Well* and the device is allowed to incubate at room temperature for 15 minutes. During the incubation, any glutamate dehydrogenase and toxins A and B in the sample bind to the antibody-peroxidase conjugates. The antigen-antibody-conjugate complexes migrate through a filter pad to a membrane where they are captured by the immobilized glutamate dehydrogenase-specific and toxins A and B-specific antibodies in the lines. The *Reaction Window* is subsequently washed with *Wash Buffer*, followed by the addition of *Substrate*. After a 10 minute incubation period, the “Ag” reaction is examined visually for the appearance of a vertical blue line on the “Ag” side of the *Reaction Window*. A blue line indicates a positive test. If the “Ag” is positive, then the “Tox” reaction should be examined visually for the appearance of a blue line on the “Tox” side of the *Reaction Window*. A blue line indicates a positive test. A positive “C” reaction, indicated by a vertical dotted blue line under the “C” portion of the *Reaction Window*, confirms that the test is working properly and the results are valid.

MATERIALS PROVIDED

MEM | DEV — ***Membrane Devices*** – each pouch contains 1 device

DIL | SPE — ***Diluent*** **(22 mL per bottle)** – Buffered protein solution with graduated dropper assembly (contains 0.05% ProClin® 300)*

WASH | REAG — ***Wash Buffer*** **(12 mL per bottle)** – Buffered solution with graduated dropper assembly (contains 0.05% ProClin® 300)*

SUBS | REAG — ***Substrate*** **(3.5 mL per bottle)** – Solution containing tetramethylbenzidine

CONJ | ENZ — ***Conjugate*** **(2.5 mL per bottle)** – Mouse monoclonal antibody specific for glutamate dehydrogenase coupled to horseradish peroxidase and goat polyclonal antibodies specific for toxins A and B coupled to horseradish peroxidase in a buffered protein solution (contains 0.05% ProClin® 300)*

CONTROL | + — ***Positive Control*** **(2 mL)** – Antigen in a buffered protein solution

Disposable plastic transfer pipettes – graduated at 25 µL, 400 µL and 500 µL

IVD — For *in vitro* diagnostic use

*Signal Word: Warning
H317: May cause an allergic skin reaction
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Small test tubes (e.g., plastic Eppendorf tubes or glass tubes)
Applicator sticks — *Timer* — *Vortex mixer*
Disposable gloves for handling fecal samples — *Pipettor and tips*

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date of the kit is given on the label. Expiration dates for each component are listed on the individual labels. The kit should be stored between 2°C and 8°C.

PRECAUTIONS

1. Reagents from different kits should not be mixed or interchanged. Do not use a kit past the expiration date.
2. Each component in the kit should be inspected for any signs of leakage. Upon arrival, inspect the kit to ensure that components are not frozen or warm to the touch due to improper shipping conditions.

EN

3. Bring all components to ROOM TEMPERATURE BEFORE USE!
4. Caps, tips and dropper assemblies are color-coded; do NOT mix or interchange!
5. Do not freeze the reagents. The kit should be stored between 2°C and 8°C.
6. The pouch containing the *Membrane Device* should be at room temperature before opening. Keep the membrane devices dry before use.
7. Use fecal specimens within 72 hours of collection to obtain optimal results. Specimens that are frozen may lose activity due to freezing and thawing. If using frozen specimens, thaw at room temperature.
8. Hold reagent bottles vertically to dispense reagents to ensure consistent drop size and correct volume.
9. Specimens and membrane devices should be handled and disposed of as potential biohazards after use.
10. Membrane devices cannot be reused.
11. The test has been optimized for sensitivity and specificity. Alterations of the specified procedure and/or test conditions may affect the sensitivity and specificity of the test. Do not deviate from the specified procedure.
12. Be attentive to the total assay time when testing more than one fecal specimen. Add *Diluent* first, and then add the *Conjugate* to each tube of *Diluent*. Then add specimen to the tube of *Diluent*/*Conjugate*. Thoroughly mix all of the diluted specimens, and transfer to the *Membrane Device*. The 15-minute incubation step begins after the last diluted sample-conjugate mixture has been transferred to the final *Membrane Device*.
13. If the *Substrate* reagent changes to a dark blue/violet color call technical services for replacement.
14. Fecal specimens may contain potentially infectious agents and should be handled at "Biosafety Level 2" as recommended in the CDC/NIH Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories."
15. All reagents are for *in vitro* diagnostic use only.
16. Wear disposable gloves when doing the test.
17. The *Diluent* reagent contains 0.05% ProClin® 300 as a preservative. Although the concentration is low, ProClin® 300 is known to be harmful. If skin irritation or rash occurs, get medical advice/attention. Take off contaminated clothing and wash it before reuse. Handle reagents according to existing regulations for laboratory safety and good laboratory practice. Safety Data Sheets for this product are available upon request, contact technical support.
18. Follow your national, regional, and local ordinances accordingly for waste disposal regulations.

COLLECTION, HANDLING AND STORAGE OF FECAL SPECIMENS

Acceptable Sample Types
Fresh Fecal Specimens
Frozen Fecal Specimens
Specimens in transport media (Cary Blair, C&S)

Do Not Use
Fecal specimens in Formalin-based fixative (e.g. sodium acetate formalin, 10% formalin, merthiolate formalin)
Fecal specimens in alcohol-based fixative (e.g. polyvinyl alcohol)

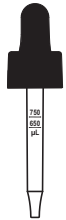
Sample Storage Temperature	Acceptable length of storage	Comments
2°C – 8°C	72 hours	Ideal specimens are less than 24 hours old
Frozen ≤ -10°C	Longer than 72 hours	Thaw at room temperature. Freezing and thawing multiple times may result in loss of specimen activity due to toxin degradation.

1. Standard collection and handling procedures used in-house for fecal specimens are appropriate.
2. Fecal specimens should be collected in clean, leak-proof containers.
3. Storing fecal specimens in the *Diluent* is NOT recommended.
4. Do not allow the fecal specimens to remain in the *Diluent*/*Conjugate* mixture for >24 hours.

SPECIMEN PREPARATION

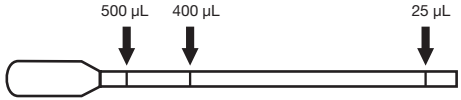
1. Bring all reagents and the required number of devices to room temperature before use. It is recommended to remove the reagents from the foam insert to reduce the time needed to warm to room temperature.
2. Set up and label one small test tube for each specimen, and optional external controls as necessary.
3. Using the black graduated dropper assembly, add 750 µL (2nd graduation from the tip) *Diluent* to each tube for fecal specimens. **For specimens in transport media such as Cary Blair or C&S, add 650 µL (1st graduation from the tip) of *Diluent* to the tube.**

Sample Type	Volume of *Diluent*
Fresh Fecal Specimens	750 µL (2nd graduation from tip)
Frozen Fecal Specimens (frozen undiluted)	750 µL (2nd graduation from tip)
Specimens in transport media (Cary Blair, C&S)	650 µL (1st graduation from the tip)
External Controls (positive and negative)	750 µL (2nd graduation from tip)



4. Add one drop of *Conjugate* (red capped bottle) to each tube.
5. Obtain one disposable plastic transfer pipette (supplied with the kit) for each sample – the pipettes have raised graduations at 25 µL, 400 µL and 500 µL.

Graduated Transfer Pipette:



6. **Mix all specimens thoroughly regardless of consistency- it is essential that the specimens be evenly suspended before transferring.**
   Liquid/Semi-solid specimens – pipette 25 µL of specimen with a transfer pipette and dispense into the *Diluent*/*Conjugate* mixture. Use the same transfer pipette to mix the diluted specimen.
   Formed/Solid specimens – Care must be taken to add the correct amount of formed feces to the sample mixture. Mix the specimen thoroughly using a wooden applicator stick and transfer a small portion (approximately 2 mm diameter, the equivalent of 25 µL) of the specimen into the

EN

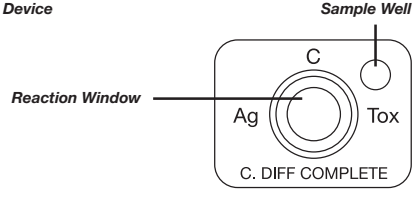
Diluent/Conjugate mixture. Emulsify the specimen using the applicator stick.
Fecal specimens in Cary Blair or C&S transport media - pipette 100 µL (2 drops from transfer pipette) of sample into the *Diluent/Conjugate* mixture.

7. **Optional External Control Samples:**
   External Positive Control - add one drop of *Positive Control* (gray-capped bottle) into the *Diluent/Conjugate* mixture.
   External Negative Control - add 25 µL *Diluent* into the *Diluent/Conjugate* mixture.

NOTE: Transferring too little specimen, or failure to mix and completely suspend the specimen in the Diluent/Conjugate mixture, may result in a false-negative test result. The addition of too much fecal specimen may cause invalid results due to restricted sample flow.

TEST PROCEDURE

1. Obtain one *Membrane Device* per specimen, and one device per optional external positive or negative control as necessary. The foil bags containing the devices should be brought to room temperature before opening. Use the device immediately after opening. Label each device appropriately and orient it on a flat surface so the "C. DIFF COMPLETE" print is at the bottom of the device, and the small *Sample Well* is located in the top right corner of the device.



2. Close each tube of diluted specimen and mix thoroughly. Proper mixing can be achieved by vortexing or inverting the tube. Once a patient sample or *Positive Control* has been diluted in the *Diluent/Conjugate* mixture, it may be incubated at room temperature for any period of time up to 24 hours prior to addition to the *Membrane Device*.
3. Using a new transfer pipette, transfer 500 µL of the diluted sample-conjugate mixture into the ***Sample Well*** (smaller hole in the top right corner of the device) of a *Membrane Device*, making certain to expel the liquid sample onto the wicking pad inside of the *Membrane Device*. When loading the sample into the sample well, make sure that the tip of the transfer pipette is angled towards the *Reaction Window* (larger hole in the middle of the device).
4. Incubate the device at room temperature for 15 minutes – the sample will wick through the device and a wet area will spread across the *Reaction Window*.
   NOTE FOR SAMPLES THAT FAIL TO MIGRATE:
   Occasionally, a diluted sample fails to migrate properly and the Reaction Window does not fully wet. If the Reaction Window does not appear to be completely wet within 5 minutes of adding the sample to the Sample Well, then add 100 µL (4 drops) of Diluent to the Sample Well and wait an additional 5 minutes (for a total of 20 minutes).
5. After the incubation, add 300 µL of *Wash Buffer* to the ***Reaction Window*** using the graduated white dropper assembly. Allow the *Wash Buffer* to flow through the Reaction Window membrane and be absorbed completely.
6. Add 2 drops of *Substrate* (white-capped bottle) to the ***Reaction Window***. Read and record results visually after 10 minutes.

INTERPRETATION OF RESULTS

1. Interpretation of the test is most reliable when the device is read immediately at the end of the 10 minute reaction period. Read the device at a normal working distance in a well-lit area. View with a line of vision directly over the device.
2. Observe device for the appearance of blue dots in the middle of the *Reaction Window* representing the internal positive control. The appearance of any control dot(s) represents a valid internal control. The background may appear white to light blue in color. Observe device for the appearance of blue lines on the "Ag" and "Tox" sides of the *Reaction Window* representing the test lines. The lines may appear faint to dark in intensity.
3. **Positive Antigen ("Ag") Result:** A positive antigen result may be interpreted at any time between the addition of *Substrate* and the 10-minute read time. For a positive antigen result, the blue "Ag" line and the dotted blue control line below "C" are visible (Figure 1a). The lines may appear faint to dark in intensity. An obvious partial line is interpreted as a positive result. Do not interpret membrane discoloration as a positive result. A positive result indicates the presence of *C. difficile*.
4. **Positive Antigen and Toxin ("Tox") Result:** If the antigen result is positive (i.e., a blue "Ag" line and a dotted blue control below "C" are visible), proceed to the interpretation of the toxin result. A positive toxin result may be interpreted at any time between the addition of *Substrate* and the 10-minute read time. For a positive toxin result, a blue "Tox" line is visible (Figure 1b). The line may appear faint to dark in intensity. An obvious partial line is interpreted as a positive result. Do not interpret membrane discoloration as a positive result. A positive result indicates the presence of *C. difficile* toxin.
5. **Negative Result:** A test cannot be interpreted as negative or invalid until 10 minutes following the addition of *Substrate*. A single blue dotted line is visible in the middle of the *Reaction Window,* below the "C" and no test lines are visible on the "Ag" side or the "Tox" side of the *Reaction Window,* (Figure 1c). A negative result in the antigen portion indicates *C. difficile* antigen is either absent in the specimen or is below the detection limit of the test. A negative result in the toxin portion indicates C. difficile toxin is either absent in the specimen or is below the detection limit of the test.
6. **Invalid Result:** No lines are visible in the Reaction Window (Figure 1d). The test result is invalid if a blue dotted line is not present below the "C" at the completion of the reaction period (Figures 1e, 1f, 1g).
7. **Negative Antigen ("Ag"), Positive Toxin ("Tox"):** A low percentage of specimens may test negative for antigen but positive for toxin. These samples should be considered indeterminate and retested using a fresh specimen (Figure 1h). If sample retests negative for antigen but positive for toxin, report as positive toxin result.

FIGURE 1: *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® INTERPRETATION OF RESULTS

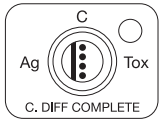


Figure 1a
Positive Antigen Result

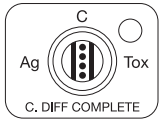


Figure 1b
Positive Antigen and Toxin Result

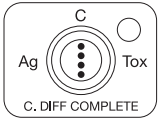


Figure 1c
Negative Result

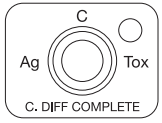


Figure 1d
Invalid Result

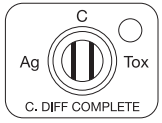


Figure 1e
Invalid Result

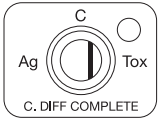


Figure 1f
Invalid Result

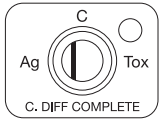


Figure 1g
Invalid Result

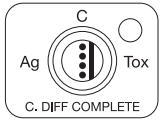


Figure 1h
See #7 for Interpretation

QUALITY CONTROL

Internal: A dotted blue line must be visible in the middle of the *Reaction Window*, below the "C" on every *Membrane Device* that is tested. The appearance of the blue control dots confirms that the sample and reagents were added correctly, that the reagents were active at the time of performing the assay, and that the sample migrated properly through the *Membrane Device*. It also confirms the reactivity of the other reagents associated with the assay. A clear background in the result area is considered an internal negative control. If the test has been performed correctly and reagents are working properly, the background will be white to give a discernible result.

External: The reactivity of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® kit should be verified upon receipt using the *Positive Control* and negative control (*Diluent*). The *Positive Control* is supplied with the kit (gray-capped bottle). The *Positive Control* confirms the reactivity of the other reagents associated with the assay, and is not intended to ensure precision at the analytical assay cut-off. *Diluent* is used for the negative control. Additional tests can be performed with the controls to meet the requirements of local, state and/or federal regulations and/or accrediting organizations.

LIMITATIONS

1. The *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test is used to detect C. difficile antigen and toxin(s) in fecal specimens. The test confirms the presence of toxin in feces and this information should be taken under consideration by the physician in light of the clinical history and physical examination of the patient. The *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test will detect levels of toxin A at ≥0.63 ng/mL, toxin B at ≥0.16 ng/mL, and glutamate dehydrogenase at ≥0.8 ng/mL.
2. Fecal specimens are extremely complex. Optimal results with the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test are obtained with specimens that are less than 24 hours old. Most undiluted specimens can be stored between 2°C and 8°C for 72 hours before significant degradation of the toxin is noted. If specimens are not assayed within this time period, they may be frozen and thawed. However, repeated freezing and thawing may result in loss in the immunoreactivity of antigen and toxins A and B.
3. Some specimens may give weak reactions. This may be due to a number of factors such as the presence of low levels of antigen and/or toxin, the presence of binding substances, or inactivating enzymes in the feces. The lines may appear faint to dark in intensity. These specimens should be reported as positive if any blue line, even a partial line is observed. An obvious partial blue line is interpreted as a positive result.
4. Fecal specimens preserved in 10% Formalin, merthiolate formalin, sodium acetate formalin, or polyvinyl alcohol cannot be used.
5. The *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test is qualitative. The intensity of the color should not be interpreted quantitatively.
6. Some isolates of *C. sordellii* may react in the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test due to the production of immunologically related toxins (1).
7. Colonization rates of up to 50% have been reported in infants. A high rate has also been reported in cystic fibrosis patients (1,3). Results may appear positive in these groups, but should be viewed in conjunction with the potential to be a colonized carrier.
8. The only non-*C. difficile* organism to react in the toxin portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test was *Clostridium sordellii* VPI 9048. This strain produces toxins HT and LT, which are homologous to toxins A and B, respectively.
9. No data exists on the effects of colonic washes, barium enemas, laxatives, or bowel preparations on the performance of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test. All of these procedures can result in extensive dilution or the presence of additives that may affect test performance.

EXPECTED VALUES

Clostridium difficile disease is primarily a nosocomial disease of elderly patients, and the frequency of the disease is dependent on factors such as patient population, type of institution and epidemiology. The reported incidence of *C. difficile* disease in patients with antibiotic-associated diarrhea may range from 5 to 20%, and hospitals may experience rates lower or higher than this range. It is important to consider any test results in conjunction with clinical symptoms because some healthy adults and large numbers of healthy infants (up to 50%) will be positive for *C. difficile* toxin. In addition, *C. difficile* carriage rates of 22% to 32% have been reported in cystic fibrosis patients (1,3). In the studies conducted for this device, using symptomatic patients, the incidence of toxins A and B was 12% and GDH was 18%. A positive result in the antigen portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test confirms the presence of *C. difficile* in a fecal specimen; a negative result indicates the absence of the organism. A positive result in the toxin portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® confirms the presence of *C. difficile* toxin in a fecal specimen; a negative result indicates the absence of toxin or insufficient levels of toxin for detection.

EN

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical evaluation of the antigen portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test

The antigen portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test was compared to bacterial culture. Specimens included in the evaluation were submitted to the clinical laboratories for routine testing. The bacterial culture test was performed according to in-house procedures. The results are shown in Table 1.

Table 1. Summary of clinical performance comparing *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test to bacterial culture

n = 1126	Bacterial Culture Positive	Bacterial Culture Negative
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigen Line Positive	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigen Line Negative	21	842

		95% Confidence Limits
Sensitivity	90.5%	85.7 – 93.9
Specificity	93.1%	91.2 – 94.7
Predictive Positive Value	76.4%	70.7 – 81.3
Predictive Negative Value	97.6%	96.2 – 98.4
Correlation	92.6%	91.8 – 93.4

Discrepant samples were evaluated using current ELISA tests for *C. difficile* glutamate dehydrogenase.
Twenty-nine of the 62 false positive samples were positive by another GDH test, and were considered true positives.
Thirteen of the 21 false negative samples were negative by another GDH test, and were considered true negatives.

The antigen portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test was compared to the tissue culture assay for the detection of C. difficile toxin. Specimens included in the evaluation were submitted to the clinical laboratories for routine testing. The results are shown in Table 2. The antigen portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test detected 98,7% of the tissue culture-positive samples.

Table 2. Summary of clinical performance comparing *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test to the tissue culture assay

n = 1126	Tissue Culture Positive	Tissue Culture Negative
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigen Line Positive	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigen Line Negative	2	861

Clinical evaluation of the toxin portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test

The toxin portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test was compared to the tissue culture assay at two clinical laboratories and in-house at TECHLAB®, Inc. Specimens included in the evaluation were submitted to the clinical laboratories for routine testing. The results are shown in Table 3.

Table 3. Summary of clinical performance comparing *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test to tissue culture assay

n = 1126	Tissue Culture Positive	Tissue Culture Negative
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxin Line Positive	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxin Line Negative	19	964

		95% Confidence Limits
Sensitivity	87.8%	81.4 - 92.3
Specificity	99.4%	98.6 - 99.7
Predictive Positive Value	95.8%	90.7 - 98.3
Predictive Negative Value	98.1%	96.9 - 98.8
Correlation	97.8%	97.6 - 98.0

Discrepant samples were evaluated using current ELISA tests for toxins A and B.
Five of the 6 false positive samples were positive by ELISA and were considered true positives.
Twelve of the 19 false negative samples were negative by ELISA and were considered true negatives.

EFFECT OF FECAL SPECIMEN CONSISTENCY

Effect of fecal specimen consistency on the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test

The reaction of fecal specimens of varying consistencies in the antigen portion (n=978) and toxin portion (n=981) of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test is shown in Tables 4 and 5. The percentages of positive reactions using either culture assay or the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test were similar in all three types of fecal specimens (liquid, semi-solid, and solid). All of the specimens were submitted for C. difficile testing. The basis of the submission was the clinical history of the patient and not the consistency of the specimen. In the antigen portion, the results show that the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test performed similarly to bacterial culture when testing samples of different consistencies. In the toxin portion, the results show the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test performed similarly to the tissue culture assay when testing samples of different consistencies.

Table 4. Reaction of fecal specimens of varying consistencies in the antigen portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test

Number of specimens (n = 978)	Liquid Specimens (n = 335)	Semi-solid Specimens (n = 522)	Solid Specimens (n = 121)
Positive by bacterial culture assay	59 (17.6%)	110 (21.1%)	19 (15.7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigen Line Positive	72 (21.5%)	128 (24.5%)	25 (20.7%)
Negative by bacterial culture assay	276 (82.4%)	412 (78.9%)	102 (84.3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigen Line Negative	263 (78.5%)	394 (75.5%)	96 (79.3%)

Table 5. Reaction of fecal specimens of varying consistencies in the toxin portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test

Number of specimens (n = 981)	Liquid Specimens (n = 336)	Semi-solid Specimens (n = 523)	Solid Specimens (n = 122)
Positive by tissue culture assay	43 (12.8%)	81 (15.5%)	8 (6.6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxin Line Positive	42 (12.5%)	72 (13.8%)	7 (5.7%)
Negative by tissue culture assay	293 (87.2%)	442 (84.5%)	114 (93.4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxin Line Negative	294 (87.5%)	451 (86.2%)	115 (94.3%)

ANALYTICAL SENSITIVITY

The cutoff for the assay was established at concentrations of 0.63 ng/mL for toxin A, 0.16 ng/mL for toxin B, and 0.8 ng/mL for glutamate dehydrogenase.

REPRODUCIBILITY

The reproducibility of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test was determined using 12 fecal specimens that were coded to prevent their identification during testing. Testing was performed at 3 independent laboratories, which tested the samples for 3 days. The samples produced the expected results 100% of the time.

CROSS REACTIVITY

Fecal specimens inoculated with the following microorganisms to a final concentration of approximately 10^8 or higher organisms per mL did not react in the antigen or toxin portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test:

Bacterium or Pathogen: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (nontoxigenic)*, Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC*, Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7*, Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans)*, Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

The only non-*C. difficile* organism to react in the toxin portion of the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test was *Clostridium sordellii* VPI 9048. This strain produces toxins HT and LT, which are homologous to toxins A and B, respectively.

The following viruses of $10^{3.3}$ to $10^{8.25}$ TCID units per 0.2 mL did not react in the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test:

Viruses: Adenovirus types 1, 2, 3, 5, 40, 41, Human coronavirus, Coxsackievirus B2, B3, B4, B5, Echovirus 9, 11, 18, 22, 33, Enterovirus type 68, 69, 70, 71, Rotavirus.

INTERFERING SUBSTANCES

The following substances (U.S. formulation) had no effect on test results when present in feces in the concentrations indicated: mucin (3.5% w/v), human blood (40% v/v), barium sulfate (5% w/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), steric/palmitic acid (40% w/v), Metronidazole (0.25% w/v), Vancomycin (0.25% w/v).

REACTION OF CLINICAL ISOLATES OBTAINED ON CYCLOSERINE-CEFOXITIN-FRUCTOSE AGAR (CCFA)

A total of 103 *C. difficile* clinical isolates, obtained by anaerobic bacterial culture on CCFA after 3 days at 37°C, were tested in the *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® test. For the analysis, individual colonies were picked and suspended in *Diluent* as recommended for fecal specimens. All 103 isolates gave a positive antigen reaction in the test.

Seventy of the 103 isolates (68%) were from fecal specimens that were positive for *C. difficile* toxin by tissue culture assay. Of these, 56 (80%) gave a positive toxin reaction when screened following anaerobic growth on CCFA for 3 days at 37°C.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

USO PREVISTO

El test TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* es un enzimoinmunoensayo rápido de membrana para la detección simultánea del antígeno glutamato deshidrogenasa de *Clostridium difficile* y de toxinas A y B en un mismo pocillo de reacción. El test detecta el antígeno de *C. difficile*, la glutamato deshidrogenasa, como criba para detectar la presencia de *C. difficile* y confirma la presencia de *C. difficile* toxigénica a través de la detección de las toxinas A y B en muestras fecales de personas sospechosas de padecer una enfermedad causada por *C. difficile*. El test debe utilizarse como ayuda para el diagnóstico de la enfermedad causada por *C. difficile*. Como ocurre con otros tests para *C. difficile*, los resultados deben evaluarse siempre junto con los antecedentes del paciente.

FUNDAMENTO

Después del tratamiento con antibióticos, muchos pacientes sufren problemas gastrointestinales que varían entre la diarrea leve y la colitis pseudomembranosa grave. Gran parte de los casos más leves de enfermedad gastrointestinal y la mayoría de los casos de colitis pseudomembranosa están causados por cepas toxigénicas de *Clostridium difficile* (1). Este microorganismo es una bacteria anaerobia oportunista que crece en el intestino cuando la flora normal es alterada por un antibiótico. Las cepas toxigénicas de *C. difficile* son portadoras de los genes que codifican las toxinas mientras que las cepas no toxigénicas no contienen estos genes de toxinas. La aparición de la enfermedad está asociada a las toxinas producidas por el microorganismo toxigénico. Se cree que los síntomas clínicos asociados a la enfermedad están causados principalmente por la toxina A, una enterotoxina que lesiona los tejidos (2,3). *C. difficile* también produce una segunda toxina, denominada toxina B. La toxina B, mencionada como la citotoxina del microorganismo, se detecta mediante los análisis de cultivos tisulares que se utilizan actualmente en numerosos laboratorios. Las cepas toxigénicas de *C. difficile* producen ambas toxinas o sólo la toxina B (4-7). La glutamato deshidrogenasa de *C. difficile* es un buen marcador antigénico del microorganismo en las heces, porque lo producen en grandes cantidades tanto las cepas toxigénicas como las no toxigénicas (8-10). El antígeno puede detectarse en las muestras fecales con el test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Un resultado positivo del test para la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile* confirma la presencia de este microorganismo en una muestra fecal, mientras que un resultado negativo indica la ausencia del microorganismo. A su vez, un resultado positivo en el ensayo para las toxinas A y B confirma la presencia de *C. difficile* toxigénica.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* utiliza anticuerpos específicos frente a la glutamato deshidrogenasa y las toxinas A y B de *C. difficile*. El dispositivo contiene una ventana de reacción con tres líneas verticales con anticuerpos inmovilizados. La línea de antígeno ("Ag") del test contiene anticuerpos frente a la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile*. La línea de control ("C") es una línea de puntos que contiene anticuerpos anti-peroxidasa de rábano picante (HRP). La línea de toxinas A y B ("Tox") del test contiene anticuerpos frente a las toxinas A y B de *C. difficile*. El *conjugado* consiste en anticuerpos frente a la glutamato deshidrogenasa y anticuerpos frente a las toxinas A y B unidos a la peroxidasa de rábano. Para realizar el test, la muestra se añade a un tubo que contiene una mezcla de *diluyente* y *conjugado*. La mezcla muestra-conjugado diluida se añade al *pocillo de muestra* y el dispositivo se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Durante la incubación, cualquier cantidad de glutamato deshidrogenasa y de toxinas A y B presente en la muestra se une a los conjugados anticuerpo-peroxidasa. Los complejos antígeno-anticuerpo-conjugado migran a través de un filtro almohadillado a una membrana donde los captan los anticuerpos específicos de la glutamato deshidrogenasa y las toxinas A y B inmovilizados en las líneas. A continuación, se lava la *ventana de reacción* con *tampón de lavado*, seguido por la adición de *sustrato*. Tras una incubación de 10 minutos, se comprueba visualmente en la reacción "Ag" la aparición de una línea azul vertical en el lado "Ag" de la *ventana de reacción*. La presencia de una línea azul indica un resultado positivo. Si el "Ag" es positivo, entonces debe comprobarse visualmente en la reacción "Tox" si aparece una línea azul en el lado "Tox" de la *ventana de reacción*. La presencia de una línea azul indica un resultado positivo. Una reacción positiva "C", indicada por una línea azul de puntos vertical bajo la parte "C" de la *ventana de reacción* confirma que el test funciona adecuadamente y que los resultados son válidos.

MATERIALES SUMINISTRADOS

MEM | DEV — ***Dispositivos de membrana*** – cada bolsa contiene 1 dispositivo

DIL | SPE — ***Diluyente* (22 ml por frasco)** – Solución tamponada proteínica con cuentagotas graduado (contiene ProClin® 300 al 0,05%)*

WASH | REAG — ***Tampón de lavado* (12 ml por frasco)** – Solución tamponada con cuentagotas graduado (contiene ProClin® 300 al 0,05%)*

SUBS | REAG — ***Sustrato* (3,5 ml por frasco)** – Solución con tetrametilbenzidina

CONJ | ENZ — ***Conjugado* (2,5 ml por frasco)** – Anticuerpo monoclonal de ratón específico para la glutamato deshidrogenasa unida a peroxidasa de rábano picante y anticuerpos policlonales de cabra específicos para las toxinas A y B unidos a peroxidasa de rábano picante en una solución tamponada proteínica (contiene ProClin® 300 al 0,05%)*

CONTROL | + — ***Control positivo* (2 ml)** – Antígeno en una solución tamponada proteínica

Pipetas de plástico desechables – graduadas a 25 µL, 400 µL y 500 µL

IVD — Para uso diagnóstico *in vitro*

*Palabra de advertencia: Advertencia
H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

MATERIALES Y EQUIPAMIENTO NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Tubos de ensayo pequeños (p. ej., tubos de plástico Eppendorf o tubos de vidrio)
Varillas aplicadoras — *Cronómetro* — *Mezclador de tipo vórtex*
Guantes desechables para manipular las muestras fecales — *Pipeta y puntas de pipeta*

PERÍODO DE VALIDEZ Y CONSERVACIÓN

La fecha de caducidad del kit se indica en la etiqueta. Las fechas de caducidad de los componentes se indican en sus correspondientes etiquetas. El kit debe conservarse a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.

PRECAUCIONES

1. No deben mezclarse ni intercambiarse reactivos de kits diferentes. No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
2. Cada componente del kit debe inspeccionarse por cualquier posible signo de fugas. A su recepción, se inspeccionará el kit para comprobar que los componentes no están congelados ni calientes al tacto debido a condiciones de envío inadecuadas.
3. ANTES DEL USO, deje que todos los componentes alcancen la TEMPERATURA AMBIENTE.

4. Los tapones, las puntas y los cuentagotas están codificados con colores y NO deben mezclarse.
5. No congele los reactivos. El kit debe conservarse a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.
6. La bolsa que contiene el *dispositivo de membrana* debe estar a temperatura ambiente antes de abrirse. Mantenga secos los dispositivos de membrana antes de su uso.
7. Para obtener unos resultados óptimos las muestras fecales deben analizarse en un plazo no superior a 72 horas desde su recogida. Las muestras congeladas pueden perder su actividad como consecuencia de los procesos de congelación y descongelación. Si se utilizan muestras congeladas, descongele a temperatura ambiente.
8. Cuando añada los reactivos, sujete los frascos de los reactivos en posición vertical con el fin de asegurar que el tamaño de las gotas sea consistente y que el volumen sea correcto.
9. Las muestras y los dispositivos de membrana deben manipularse y eliminarse después del uso como materiales biológicos potencialmente peligrosos.
10. Los dispositivos de membrana no pueden volver a utilizarse.
11. La prueba se ha optimizado para mejorar la sensibilidad y la especificidad. Las alteraciones del procedimiento especificado y/o de las condiciones de la prueba pueden afectar a su sensibilidad y especificidad. No se desvíe del procedimiento especificado.
12. Preste atención al tiempo total del análisis cuando realice la prueba con más de una muestra fecal. Añada primero el *diluyente* y a continuación añada el *conjugado* a cada tubo de *diluyente*. Después añada la muestra al tubo de *diluyente/conjugado*. Mezcle bien todas las muestras diluidas y, a continuación, transfiéralas al *dispositivo de membrana*. El paso de incubación de 15 minutos comienza después de que se haya transferido la última mezcla de muestra-conjugado diluida al *Dispositivo de membrana* final.
13. Si el reactivo del *sustrato* adquiere un color azul oscuro/violeta, avise al Servicio técnico para su sustitución.
14. Las muestras fecales pueden contener agentes potencialmente infecciosos y deben manejarse en un "Nivel de Bioseguridad 2", tal como se recomienda en el Manual de los CDC/NIH, "Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos".
15. Todos los reactivos son exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.
16. Utilice guantes desechables para realizar la prueba.
17. Los reactivos contienen ProClin® 300 al 0,05% como conservante. Aunque la concentración es baja, se sabe que ProClin® 300 es nocivo. En caso de irritación o erupción cutánea, consultar a un médico. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Manejar los reactivos de acuerdo con las normas existentes de seguridad de laboratorio y buenas prácticas de laboratorio. Se dispone de fichas de datos de seguridad de este producto bajo pedido, consultar al soporte técnico.
18. Siga las normas nacionales, regionales y locales para consultar los reglamentos de eliminación de residuos.

RECOGIDA, MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS FECALES

Tipos de muestra aceptables	No utilizar
Muestras fecales recientes	Muestras fecales con fijación basada en formol (p. ej., formol acetato sódico, formol al 10%, formol mertiolato)
Muestras fecales congeladas	Muestras fecales en fijación basada en alcohol (p. ej., alcohol polivinílico)
Muestras en medios de transporte (Cary Blair, C&S)	

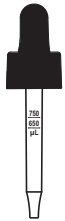
Almacenamiento de la muestra Temperatura	Duración aceptable del almacenamiento	Comentarios
2 °C – 8 °C	72 horas	Las muestras perfectas tienen menos de 24 horas
Congelado a ≤ -10°C	Más de 72 horas	Descongelar a temperatura ambiente. La realización de múltiples ciclos de congelación y descongelación puede provocar la pérdida de actividad de la muestra debida a la degradación de la toxina.

1. Los procedimientos internos estándar de recogida y manipulación de las muestras fecales son adecuados.
2. Las muestras fecales deben recogerse en recipientes limpios, a prueba de fugas.
3. NO se recomienda conservar las muestras fecales en el *Diluyente*.
4. No permita que las muestras fecales permanezcan en la mezcla de *diluyente/conjugado* durante más de 24 horas.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

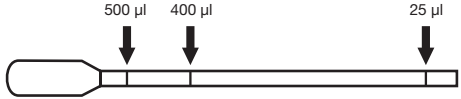
1. Espere hasta que todos los reactivos y el número de dispositivos que sean necesarios se encuentren a temperatura ambiente antes de su uso. Se recomienda retirar los reactivos de la tira de espuma para reducir el tiempo necesario para calentarlos a temperatura ambiente.
2. Asigne e identifique un tubo de ensayo pequeño para cada muestra así como controles externos opcionales según sea necesario.
3. Añada 750 µl de *diluyente* (2° graduación desde la punta) a cada tubo de muestras fecales utilizando el cuentagotas graduado negro. **En el caso de muestras en medios de transporte como Cary Blair o C&S, añada 650 µl (1° graduación desde la punta) de *diluyente* al tubo.**

Tipo de muestra	Volumen de *diluyente*
Muestras fecales recientes	750 µl (2° graduación desde la punta)
Muestras fecales congeladas (congeladas sin diluir)	750 µl (2° graduación desde la punta)
Muestras en medios de transporte (Cary Blair, C&S)	650 µl (1° graduación desde la punta)
Controles externos (positivos y negativos)	750 µl (2° graduación desde la punta)



4. Añada una gota de *conjugado* (frasco con tapón rojo) a cada tubo.
5. Utilice una pipeta de plástico desechable (suministrada con el kit) para cada muestra – las pipetas tienen graduaciones a 25 µl, 400 µl y 500 µl.

Pipeta graduada:

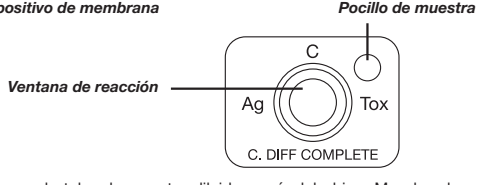


6. **Mezcle bien todas las muestras independientemente de su consistencia ya que es muy importante obtener una suspensión homogénea de las muestras antes de transferirlas.**
   Muestras líquidas/semisólidas – Pipetee 25 µl de muestra con una pipeta (aquí hemos borrado el paréntesis) y añádala a la mezcla de *diluyente/conjugado*. Utilice la misma pipeta para mezclar la muestra diluida.
   Muestras formadas/sólidas – Es preciso tener cuidado para añadir el volumen correcto de heces formadas a la mezcla de muestra. Mezcle bien la muestra con una varilla aplicadora de madera y transfiera una parte pequeña (aproximadamente de 2 mm de diámetro, el equivalente de 25 µl) de la muestra a la mezcla de diluyente/conjugado. Emulsione la muestra con la varilla aplicadora.
   Muestras fecales en medios de transporte Cary Blair o C&S - Pipetee 100 µl (2 gotas de la pipeta) de muestra a la mezcla de *diluyente/conjugado*.
7. **Muestras opcionales de control externo:**
   Control positivo externo - Añada una gota de *control positivo* (frasco con tapón gris) a la mezcla de *diluyente/conjugado*.
   Control negativo externo - Añada 25 µL de *diluyente* a la mezcla de *diluyente/conjugado*.

NOTA: Si se transfiere una cantidad muy reducida de muestra o si no se mezcla y se suspende completamente la muestra en la mezcla de diluyente/conjugado puede obtenerse un resultado falso negativo en la prueba. Si se añade una cantidad excesiva de heces, pueden obtenerse resultados no válidos debido al reducido flujo de la muestra.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

1. Obtenga un *dispositivo de membrana* por muestra y un dispositivo para el control positivo o negativo externo opcional, según sea necesario. Las bolsas de papel de aluminio que contienen los dispositivos deben estar a temperatura ambiente antes de proceder a su apertura. Utilice el dispositivo inmediatamente después de abrir. Identifique los dispositivos de forma apropiada y oriéntelos en una superficie plana de forma que la inscripción "C. DIFF COMPLETE" del dispositivo se encuentre en el fondo del mismo y el pocillo de muestra pequeño se encuentre en la esquina superior derecha del dispositivo.



2. Cierre cada tubo de muestra diluida y mézclelo bien. Mezcle adecuadamente con vórtex o invirtiendo el tubo. Una vez diluida la muestra de paciente o el *control positivo* en la mezcla de *diluyente/conjugado*, esta puede incubarse a temperatura ambiente durante cualquier período de tiempo hasta 24 horas antes de la adición al *dispositivo de membrana*.
3. Utilice una nueva pipeta, transfiera 500 µl de la mezcla de muestra-conjugado diluida al ***pocillo de muestra*** (orificio más pequeño en la esquina superior derecha del dispositivo) de un *dispositivo de membrana* y asegúrese de que expulsa la muestra líquida en la almohadilla de absorción del interior del *dispositivo de membrana*. Cuando cargue la muestra en el pocillo, compruebe que la punta de la pipeta está angulada hacia la *ventana de reacción* (orificio mayor en el centro del dispositivo).
4. Incube el dispositivo a temperatura ambiente durante 15 minutos – la muestra se absorberá a través del dispositivo y el área húmeda se extenderá en la *ventana de reacción*.

NOTA PARA LAS MUESTRAS QUE NO MIGRAN:
Ocasionalmente, una muestra diluida no migra adecuadamente y la ventana de reacción no se humedece completamente. Si la ventana de reacción no aparece completamente húmeda en el plazo de 5 minutos después de añadir la muestra al pocillo, añada 100 µl (4 gotas) de diluyente al pocillo y espere otros 5 minutos (para un total de 20 minutos).

5. Después de la incubación, añada 300 µl de *solución de tampón de lavado* a la ***ventana de reacción*** utilizando el cuentagotas blanco graduado. Deje que la *solución de lavado* penetre en la membrana de la ventana de reacción y se absorba completamente.
6. Añada 2 gotas de *sustrato* (frasco con tapón blanco) a la ***ventana de reacción***. Lea y anote los resultados observados después de 10 minutos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. La interpretación del test es más fiable cuando se lee el dispositivo inmediatamente después del periodo de reacción de 10 minutos. Lea el dispositivo a una distancia normal en una zona bien iluminada. Dirija la mirada a la línea de visión situada directamente sobre el dispositivo.
2. Observe la aparición de puntos azules en el centro de la *ventana de reacción* que representa el control positivo interno. La presencia de cualquier punto de control representa un control interno válido. El fondo puede mostrarse de color blanco a azul claro. Observe la aparición en el dispositivo de líneas azules en los lados "Ag" y Tox" de la *ventana de reacción* que representan las líneas de test. El color de las líneas puede ser débil o intenso.
3. **Resultado positivo de antígeno ("Ag"):** Un resultado positivo de antígeno puede interpretarse en cualquier momento entre la adición del *sustrato* y el tiempo de lectura de 10 minutos. Para que un resultado de antígeno sea positivo deben ser visibles la línea azul "Ag" y la línea de control de puntos azules debajo de "C" (Figura 1a). El color de las líneas puede ser débil o intenso. Una línea parcialmente visible se interpreta como un resultado positivo. No interprete la decoloración de la membrana como un resultado positivo. Un resultado positivo indica la presencia de *C. difficile*.
4. **Resultado positivo de antígeno y toxina ("Tox"):** Si el resultado de antígeno es positivo (es decir, están visibles la línea azul "Ag" y la línea de control de puntos azules debajo de "C"), pase a interpretar el resultado de la toxina. Un resultado positivo para la toxina puede interpretarse en cualquier momento entre la adición del *sustrato* y el tiempo de lectura de 10 minutos. En caso de resultado positivo de toxina resulta visible una línea azul "Tox" (Figura 1b). La línea puede tener una intensidad débil o intensa. Una línea parcialmente visible se interpreta como un resultado positivo. No interprete la decoloración de la membrana como un resultado positivo. Un resultado positivo indica la presencia de las toxinas de *C. difficile*.
5. **Resultado negativo:** Un test no puede interpretarse como negativo o no válido hasta 10 minutos después de la adición del *sustrato*. Se observa una única línea azul de puntos en el centro de la *ventana de reacción*, debajo de "C" y no hay líneas de test visibles en el lado "Ag" o en el lado "Tox" de la *ventana de reacción* (Figura 1d). Un resultado negativo en la parte de antígeno indica que el antígeno de *C. difficile* está ausente en la muestra o está por debajo del límite de detección del test. Un resultado negativo en la parte de toxina indica que la toxina de C. difficile está ausente en la muestra o está por debajo del límite de detección del test.
6. **Resultado no válido:** No hay líneas visibles en la ventana de reacción (Figura 1d). El resultado del test no es válido si no se encuentra presente una línea de de puntos azules debajo de "C" al terminar el período de reacción (Figuras 1e, 1f, 1g).
7. **Antígeno ("Ag") negativo, toxina ("Tox") positiva:** Un reducido porcentaje de muestras pueden dar resultado negativo para el antígeno pero positivo para la toxina. Estas muestras deberán ser consideradas como indeterminadas y analizadas de nuevo utilizando una muestra fresca (Figura 1h). Si el nuevo análisis da negativo para antígeno pero positivo para toxina, clasifíquelo como un resultado positivo para toxina.

FIGURA 1: INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

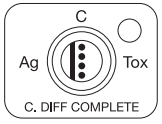


Figura 1a
Resultado positivo de antígeno

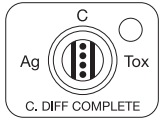


Figura 1b
Resultado positivo de antígeno y toxina

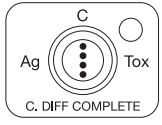


Figura 1c
Resultado negativo

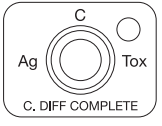


Figura 1d
Resultado no válido

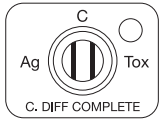


Figura 1e
Resultado no válido

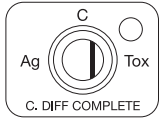


Figura 1f
Resultado no válido

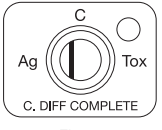


Figura 1g
Resultado no válido

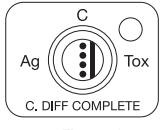


Figura 1h
Ver el punto 7 para la interpretación

CONTROL DE CALIDAD

Interno: Debe observarse una línea azul de puntos en el centro de la *ventana de reacción*, debajo de "C" en cada *dispositivo de membrana* que se estudie. La aparición de los puntos azules de control confirma que se han añadido correctamente la muestra y los reactivos, que los reactivos estaban activos durante la realización del análisis y que la mezcla ha migrado adecuadamente a través del *dispositivo de membrana*. Confirma también la reactividad de los otros reactivos asociados al ensayo. Un fondo transparente en el área de resultados se considera como un control negativo interno. Si el test se ha realizado adecuadamente y los reactivos funcionan correctamente, el fondo será blanco para dar un resultado apreciable.
Externo: La reactividad del kit *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* debe comprobarse al recibir el kit usando el *Control positivo* y el control negativo (*Diluyente*). El *control positivo* se suministra con el kit (frasco con tapón gris). El *control positivo* se utiliza para verificar la reactividad de los demás reactivos del ensayo y su objetivo no es asegurar la precisión del punto de corte del ensayo. El *Diluyente* se utiliza para el control negativo. Pueden realizarse tests adicionales con los controles para cumplir los requisitos administrativos locales, regionales o federales y los de los organismos de acreditación.

LIMITACIONES

1. El test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* se utiliza para detectar el antígeno y la(s) toxina(s) de C. difficile en muestras fecales. El test confirma la presencia de toxinas en heces y esta información deberá ser analizada por el médico junto con la anamnesis y la exploración física del paciente. El test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* detecta niveles de la toxina A a ≥0,63 ng/ml, de la toxina B a ≥0,16 ng/ml y de la glutamato deshidrogenasa a ≥0,8 ng/ml.
2. Las muestras fecales son muy complejas. Los resultados óptimos en el test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* se obtienen con muestras recogidas en las 24 horas previas. La mayoría de las muestras no diluidas pueden conservarse entre 2 y 8 °C durante 72 horas antes de que se produzca una degradación significativa de las toxinas. Si las muestras no se pueden analizar en este plazo de tiempo, se pueden congelar y posteriormente descongelar. Sin embargo, si las muestras se congelan y descongelan varias veces, puede perderse la inmunorreactividad del antígeno y de las toxinas A y B.
3. En algunas muestras pueden obtenerse reacciones débilmente positivas. Esto puede deberse a diversos factores como la presencia de niveles bajos de antígeno y/o toxina o a la presencia de sustancias fijadoras o enzimas inactivadoras en las heces. El color de las líneas puede ser débil o intenso. Estas muestras se deben clasificar como positivas si se ve una línea azul, incluso si es parcialmente visible. Una línea azul parcialmente visible se interpreta como un resultado positivo
4. No pueden utilizarse muestras fecales conservadas en formol al 10%, formol-mertiolato, formol-acetato sódico o alcohol polivinílico.
5. El test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* es un test cualitativo. La intensidad del color no debe interpretarse cuantitativamente.
6. Algunos aislamientos de *C. sordellii* pueden reaccionar en el test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* debido a la producción de toxinas inmunológicamente relacionadas (1).
7. En niños se han descrito índices de colonización de hasta el 50%. Se ha descrito también un elevado índice de colonización en pacientes con fibrosis quística (1,3). En estos grupos, los resultados pueden parecer positivos aunque deben evaluarse teniendo en cuenta la posibilidad de que sean portadores colonizados.
8. El único microorganismo no de *C. difficile* que reaccionó en la parte de toxina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* fue *Clostridium sordellii* VPI 9048. Esta cepa produce las toxinas HT y LT que son homólogas a la toxina A y la toxina B, respectivamente.
9. No existen datos sobre los efectos de los lavados de colon, enemas de bario, laxantes o preparados para colonoscopia en el rendimiento del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Todos estos procedimientos pueden causar una amplia dilución o la presencia de aditivos que pueden afectar al rendimiento del test.

VALORES ESPERADOS

La enfermedad por *Clostridium difficile* es sobre todo una enfermedad nosocomial que afecta a pacientes de edad avanzada y su frecuencia depende de factores como el tipo de paciente, el tipo de institución y factores epidemiológicos. La incidencia de la enfermedad por *C.difficile* en pacientes con diarrea asociada al uso de antibióticos puede variar entre el 5 y 20% y algunos hospitales pueden presentar tasas superiores o inferiores a este intervalo. Es importante interpretar cualquier resultado junto con los síntomas clínicos, porque en algunos adultos sanos y un gran número de niños sanos (hasta el 50%) se obtienen resultados positivos para la toxina de *C. difficile*. Además, en pacientes con fibrosis quística se han descrito índices de portadores de *C. difficile* de entre el 22% y el 32% (1,3). En los estudios realizados para este dispositivo con pacientes sintomáticos la incidencia de toxinas A y B fue del 12% y la de GDH del 18%. Un resultado positivo en la parte de antígeno con el test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* confirma la presencia de *C. difficile* en una muestra fecal, mientras que un resultado negativo indica la ausencia del microorganismo. Un resultado positivo en la parte de toxina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* confirma la presencia de la toxina de *C. difficile* en una muestra fecal, mientras que un resultado negativo indica la ausencia de la toxina o unos niveles de toxina insuficientes para su detección.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Evaluación clínica de la parte de antígeno del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

Se comparó la parte de antígeno del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* con un cultivo bacteriano. Las muestras incluidas en la valoración fueron enviadas a laboratorios clínicos para los análisis de rutina. El test del cultivo bacteriano se realizó de acuerdo con los procedimientos internos. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen del rendimiento clínico en la comparación del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* con el cultivo bacteriano

n = 1126	Cultivo bacteriano Positivo	Cultivo bacteriano Negativo
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Línea de antígeno positiva	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Línea de antígeno negativa	21	842

		Límites de confianza del 95 %
Sensibilidad	90,5%	85,7 – 93,9
Especificidad	93,1%	91,2 – 94,7
Valor predictivo positivo	76,4%	70,7 – 81,3
Valor predictivo negativo	97,6%	96,2 – 98,4
Correlación	92,6%	91,8 – 93,4

Las muestras discrepantes fueron evaluadas utilizando ensayos ELISA actuales para la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile*.
Veintinueve de las 62 muestras falso positivas dieron positivas con otra prueba GDH y se consideraron como verdaderas positivas.
Trece de las 21 muestras falso negativas dieron negativas con otra prueba GDH y se consideraron como verdaderas negativas.

Se comparó la parte de antígeno del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* con el ensayo de cultivo tisular para detectar la toxina de C. difficile. Las muestras incluidas en la valoración fueron enviadas a laboratorios clínicos para los análisis de rutina. Los resultados se presentan en la Tabla 2. La parte de antígeno del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* detectó el 98,7% de las muestras con resultado positivo en el cultivo tisular.

Tabla 2. Resumen del rendimiento clínico en la comparación del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* con el ensayo de cultivo tisular

n = 1126	Cultivo tisular Positivo	Cultivo tisular Negativo
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Línea de antígeno positiva	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Línea de antígeno negativa	2	861

Evaluación clínica de la parte de toxina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

Se comparó la parte de toxina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* con el ensayo de cultivo tisular en dos laboratorios clínicos y en un laboratorio interno de TECHLAB®, Inc. Las muestras incluidas en la evaluación se remitieron a los laboratorios clínicos para realizar los análisis rutinarios. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resumen del rendimiento clínico en la comparación del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* con el ensayo de cultivo tisular

n = 1126	Cultivo tisular Positivo	Cultivo tisular Negativo
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Línea de toxina positiva	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Línea de toxina negativa	19	964

		Límites de confianza del 95 %
Sensibilidad	87,8%	81,4 - 92,3
Especificidad	99,4%	98,6 - 99,7
Valor predictivo positivo	95,8%	90,7 - 98,3
Valor predictivo negativo	98,1%	96,9 - 98,8
Correlación	97,8%	97,6 - 98,0

Las muestras discrepantes fueron evaluadas utilizando tests ELISA actuales para toxinas A y B.
Cinco de las 6 muestras falso positivas dieron positivas con ELISA y se consideraron como verdaderas positivas.
Doce de las 19 muestras falso negativas dieron negativas con ELISA y se consideraron como verdaderas negativas.

EFECTO DE LA CONSISTENCIA DE LA MUESTRA FECAL

Efecto de la consistencia de la muestra fecal en el test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

En las Tablas 4 y 5 se muestra la reacción de las muestras fecales de diferentes consistencias en la parte de antígeno (n=978) y la parte de toxina (n=981) del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. El porcentaje de reacciones positivas tanto en el ensayo de cultivo como en el test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* fue similar en los tres tipos de muestras fecales (líquidas, semi-sólidas y sólidas). Todas las muestras se remitieron para el análisis de C. difficile en las mismas. El motivo del envío de las muestras para la realización del test era la anamnesis del paciente y no la consistencia de las heces. En la parte de antígeno, los resultados demuestran que el test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* funcionó de forma similar al cultivo bacteriano cuando se analizaron muestras con consistencias diferentes. En la parte de toxina, los resultados demuestran que el test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* funcionó de forma similar al ensayo de cultivo tisular cuando se analizaron muestras con consistencias diferentes.

Tabla 4. Reacción de muestras fecales de diferentes consistencias en la parte de antígeno del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

Número de muestras (n = 978)	Muestras líquidas (n = 335)	Muestras semisólidas (n = 522)	Muestras sólidas (n = 121)
Positivas mediante el ensayo de cultivo bacteriano	59 (17,6%)	110 (21,1%)	19 (15,7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Línea de antígeno positiva	72 (21,5%)	128 (24,5%)	25 (20,7%)
Negativas mediante el ensayo de cultivo bacteriano	276 (82,4%)	412 (78,9%)	102 (84,3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Línea de antígeno negativa	263 (78,5%)	394 (75,5%)	96 (79,3%)

Tabla 5. Reacción de muestras fecales de diferentes consistencias en la parte de toxina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

Número de muestras (n = 981)	Muestras líquidas (n = 336)	Muestras semisólidas (n = 523)	Muestras sólidas (n = 122)
Positivas mediante el ensayo de cultivo tisular	43 (12,8%)	81 (15,5%)	8 (6,6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Línea de toxina positiva	42 (12,5%)	72 (13,8%)	7 (5,7%)
Negativas mediante el ensayo de cultivo tisular	293 (87,2%)	442 (84,5%)	114 (93,4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Línea de toxina negativa	294 (87,5%)	451 (86,2%)	115 (94,3%)

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

El corte para la valoración se estableció a concentraciones de 0,63 ng/ml para la toxina A, de 0,16 ng/ml para la toxina B y de 0,8 ng/ml para la glutamato deshidrogenasa.

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* se determinó utilizando 12 muestras fecales codificadas para evitar su identificación durante los análisis. El análisis se realizó en 3 laboratorios independientes que analizaron las muestras durante 3 días. Las muestras produjeron los resultados esperados en todos los casos.

REACTIVIDAD CRUZADA

Las muestras fecales inoculadas con los microorganismos que figuran a continuación a una concentración final de aproximadamente 10^8 o superior de microorganismos/ml no reaccionaron en la parte de antígeno ni en la parte de toxina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*:

Bacterias o patógenos: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (nontoxigénica)*, Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC*, Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7*, Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans)*, Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

El único microorganismo no de *C. difficile* que reaccionó en la parte de toxina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* fue *Clostridium sordellii* VPI 9048. Esta cepa produce las toxinas HT y LT que son homólogas a la toxina A y la toxina B, respectivamente.

Los siguientes virus de $10^{3,3}$ a $10^{8,25}$ unidades TCID por 0,2 ml no reaccionaron en el test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*:

Virus: tipos 1, 2, 3, 5, 40 y 41 del adenovirus, coronavirus humano, virus Coxsackie B2, B3, B4, B5, virus Echo 9, 11, 18, 22, 33, tipos 68, 69, 70 y 71 del enterovirus, rotavirus.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias (formulación de EE. UU.) no influyeron en los resultados del test cuando se encontraban presentes en las heces en las concentraciones indicadas: mucina (3,5% p/v), sangre humana (40% v/v), sulfato de bario (5% p/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), ácido estérico/ácido palmítico (40% p/v), metronidazol (0,25% p/v) y vancomicina (0,25% p/v).

REACCIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS OBTENIDOS EN AGAR DE CICLOSERINA-CEFOXITINA-FRUCTOSA (CCFA)

En total se analizaron en el test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLET®* 103 aislamientos clínicos de *C. difficile* obtenidos mediante cultivo bacteriano anaerobio en CCFA durante 3 días a 37 °C. Para el análisis se recogieron colonias individuales que se suspendieron en *diluyente* según las recomendaciones para muestras fecales. Los 103 aislamientos dieron una reacción positiva al antígeno en el test.

Setenta de los 103 aislamientos (68%) procedían de muestras fecales que habían dado positivo para la toxina de *C. difficile* en el ensayo de cultivo tisular. De estos, 56 (80%) dieron una reacción positiva a la toxina cuando se cribaron tras el crecimiento anaerobio en CCFA durante 3 días a 37 °C.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

VERWENDUNGSZWECK

Der TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* Test ist ein Membranenzymimmunoassay-Schnelltest für den gleichzeitigen Nachweis des *Clostridium difficile*-Antigens Glutamatdehydrogenase sowie Toxin A und B in einer einzigen Reaktionsvertiefung. Der Test weist das *C. Difficile*-Antigen Glutamatdehydrogenase als Screening für das Vorhandensein von *C. difficile* nach und bestätigt das Vorhandensein von toxigenem *C. difficile* mittels Nachweis von Toxin A und B in Stuhlproben von Personen mit Verdacht auf eine *C. difficile*-assoziierte Erkrankung. Der Test dient als Hilfsmittel bei der Diagnose von *C. difficile*-assoziierten Erkrankungen. Wie auch bei anderen *C. difficile*-Tests sind die Ergebnisse gemeinsam mit der Patientenanamnese zu betrachten.

ERKLÄRUNG

Nach einer Antibiotikabehandlung treten bei vielen Patienten Magen-Darm-Beschwerden auf, die von leichtem Durchfall bis zu schwerer pseudomembranöser Kolitis reichen. Viele der leichteren Magen-Darm-Erkrankungen sowie die meisten Fälle von pseudomembranöser Kolitis werden von toxigenen *Clostridium difficile*-Stämmen verursacht (1). Dieser Organismus ist ein opportunistisches anaerobes Bakterium, das sich im Darm ansiedelt, sobald die normale Darmflora durch das Antibiotikum verändert wird. Toxigene*C. difficile*-Stämme enthalten für die Toxine codierende Gene, während nicht-toxigene Stämme keine Toxingene enthalten. Der Ausbruch der Krankheit ist mit den vom toxigenen Organismus produzierten Toxinen assoziiert. Man geht davon aus, dass die mit der Erkrankung assoziierten klinischen Symptome hauptsächlich von Toxin A verursacht werden, einem gewebeschädigenden Enterotoxin (2, 3). *C. difficile* bildet noch ein zweites Toxin, das sogenannte Toxin B. Toxin B, als Zytotoxin des Organismus bezeichnet, ist jenes Toxin, das durch den in vielen Labors eingesetzten Gewebekulturtest nachgewiesen wird. Toxigene*C. difficile* -Stämme bilden entweder beide Toxine oder nur Toxin B (4-7). Die Glutamatdehydrogenase von *C. difficile* stellt einen guten Antigenmarker für den Stuhlorganismus dar, weil sie von allen Stämmen, toxigen oder nicht-toxigen, in großen Mengen produziert wird (8-10). Das Antigen lässt sich mithilfe des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* Tests in Stuhlproben nachweisen. Ein positives Ergebnis beim Test auf *C. difficile*-Glutamatdehydrogenase bestätigt, dass dieser Organismus in einer Stuhlprobe vorhanden ist. Ein negatives Testergebnis zeigt an, dass der Organismus nicht vorhanden ist. Ein positives Ergebnis beim Test auf Toxin A und B bestätigt das Vorhandensein toxigener *C. difficile*-Stämme.

TESTPRINZIP

Beim *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* Test werden für Glutamatdehydrogenase (GLDH) und Toxin A und B spezifische *C. difficile*-Antikörper eingesetzt. Die Testkarte verfügt über ein Reaktionsfenster mit drei vertikalen Linien aus immobilisierten Antikörpern. Die Antigentestlinie („Ag“) enthält Antikörper gegen *C. difficile*-Glutamatdehydrogenase. Die Kontrolllinie („C“) ist eine gepunktete Linie, die Anti-Meerrettich-Peroxidase (MRP)-Antikörper enthält. Die Toxin A- und B-Testlinie („Tox“) enthält Antikörper gegen *C. difficile*-Toxin A und B. Das Konjugat *besteht aus Antikörpern gegen Glutamatdehydrogenase und Antikörpern gegen Toxin A und B, die an Meerrettich-Peroxidase gebunden sind. Zur Durchführung des Tests wird die Probe einem Reagenzglas mit einer Mischung aus Verdünnungspuffer* und *Konjugat* hinzugefügt. Die verdünnte Proben-Konjugat-Mischung wird in die *Probenvertiefung* gegeben und die Testkarte bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubation binden in der Probe vorhandene Glutamatdehydrogenase sowie Toxin A und B an die Antikörper-Peroxidase-Konjugate. Die Antigen-Antikörper-Konjugat-Komplexe wandern durch ein Filterpad zu einer Membran, wo sie von den immobilisierten Glutamatdehydrogenase-spezifischen sowie Toxin A- und B-spezifischen Antikörpern der Linien eingefangen werden. Anschließend wird das *Reaktionsfenster* mit *Waschpuffer* gewaschen und *Substrat* zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wird die„Ag“-Reaktion mittels Sichtkontrolle auf das Erscheinen einer vertikalen blauen Linie auf der „Ag“-Seite des *Reaktionsfensters* untersucht. Eine blaue Linie weist auf einen positiven Test hin. Ist die „Ag“-Reaktion positiv, so muss die „Tox“-Reaktion mittels Sichtkontrolle auf das Erscheinen einer blauen Linie auf der „Tox“-Seite des *Reaktionsfensters* untersucht werden. Eine blaue Linie weist auf einen positiven Test hin. Eine positive „C“-Reaktion, angezeigt durch eine vertikale gepunktete blaue Linie unter dem „C“-Bereich des *Reaktionsfensters*, bestätigt, dass der Test ordnungsgemäß funktioniert und die Ergebnisse gültig sind.

DE

PACKUNGSINHALT

MEM | DEV — ***Testkarten*** – jeder Beutel enthält 1 Testkarte

DIL | SPE — ***Verdünnungspuffer* (22 ml pro Flasche)** – Gepufferte Proteinlösung mit graduiertem Tropfer (enthält 0,05 % ProClin® 300)*

WASH | REAG — ***Waschpuffer* (12 ml pro Flasche)** – Gepufferte Lösung mit graduiertem Tropfer (enthält 0,05 % ProClin® 300)*

SUBS | REAG — ***Substrat* (3,5 ml pro Flasche)** – Lösung mit Tetramethylbenzidin

CONJ | ENZ — ***Konjugat* (2,5 ml pro Flasche)** – GLDH-spezifischer monoklonaler Antikörper aus der Maus, gebunden an Meerrettich-Peroxidase, und Toxin A- und -B-spezifischer polyklonaler Antikörper aus der Ziege, gebunden an Meerrettich-Peroxidase, in einer gepufferten Proteinlösung (enthält 0,05 % ProClin® 300)*

CONTROL | + — ***Positive Kontrolle* (2 ml)**– Antigen in einer gepufferten Proteinlösung

Einweg-Kunststofftransferpipetten – graduiert bei 25 µl, 400 µl und 500 µl

IVD — Für die *in-vitro* Diagnostik

*Signalwort: Warnung
H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL (NICHT ENTHALTEN)

Kleine Reagenzgläser (z. B. Eppendorf-Reagenzgläser aus Kunststoff oder Glas)
Applikatorstäbchen *Zeitmesser* *Vortex-Schüttler*
Einweghandschuhe zur Handhabung der Stuhlproben *Pipettierer und Pipettenspitzen*

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum de s Testkits ist auf dem Packungsetikett angegeben. Das Verfallsdatum für die einzelnen Bestandteile ist auf den jeweiligen Etiketten angegeben. Das Kit muss zwischen 2° C und 8° C gelagert werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Reagenzien aus verschiedenen Kits nicht mischen oder miteinander vertauschen. Verwenden Sie das Testkit nicht nach dem Verfallsdatum.

2. Sämtliche Bestandteile des Kits müssen auf Anzeichen für Undichtigkeit untersucht werden. Bei Erhalt des Kits muss sichergestellt werden, dass die Bestandteile nicht wegen unsachgemäßer Transportbedingungen gefroren oder zu warm sind.
3. Lassen Sie alle Bestandteile VOR DER VERWENDUNG RAUMTEMPERATUR annehmen!
4. Verschlüsse, Spitzen und Tropfer sind farbkodiert; NICHT vertauschen!
5. Reagenzien nicht einfrieren. Das Kit muss zwischen 2 °C und 8 °C gelagert werden.
6. Der Beutel mit der *Testkarte* muss vor dem Öffnen Raumtemperatur angenommen haben. Testkarten vor Gebrauch trocken lagern.
7. Verwenden Sie Stuhlproben nach Entnahme innerhalb von 72 Stunden, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Gefrorene Proben können aufgrund des Einfrier- und Auftauvorgangs Aktivitätsverluste aufweisen. Gefrorene Proben bei Raumtemperatur auftauen.
8. Halten Sie die Reagenzflaschen bei der Reagenzienausgabe senkrecht, um eine einheitliche Tropfengröße und korrekte Menge sicherzustellen.
9. Proben und Testkarten nach dem Gebrauch als potenzielle biologische Gefahrstoffe behandeln und entsorgen.
10. Die Testkarten dürfen nicht wiederverwendet werden.
11. Der Test wurde auf Sensitivität und Spezifität optimiert. Abweichungen vom angegebenen Verfahren und/oder Änderungen der Testbedingungen können die Sensitivität und Spezifität des Tests beeinflussen. Halten Sie sich genau an die Anweisungen.
12. Achten Sie beim Testen mehrerer Stuhlproben auf die Gesamttestzeit. Geben Sie zuerst den *Verdünnungspuffer* und dann das *Konjugat* in jedes Reagenzglas mit *Verdünnungspuffer* hinzu. Geben Sie hierauf die Probe in das Reagenzglas mit dem *Verdünnungspuffer/Konjugat*. Mischen Sie die verdünnten Proben gründlich durch und übertragen Sie diese dann auf die *Testkarte*. Der 15-minütige Inkubationsschritt beginnt nach Übertragung der letzten verdünnten Proben-Konjugat-Mischung auf die letzte *Testkarte*.
13. Sollte das *Substratreagens* eine dunkelblaue/violette Färbung annehmen, so wenden Sie sich bitte an den Kundendienst für einen Ersatz.
14. Stuhlproben können potenzielle Infektionserreger enthalten und sind wie im CDC/NIH-Handbuch „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Labors) empfohlen nach „Biosicherheitsstufe 2“ zu handhaben.
15. Alle Reagenzien sind ausschließlich für die *in-vitro*-Diagnostik bestimmt.
16. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Einweghandschuhe.
17. Die Reagenzien enthalten 0,05 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel. Auch wenn die Konzentration gering ist, ist ProClin® 300 als schädlich bekannt. Bei Hautreizung oder -rötung, ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Reagenzien gemäß vorhandenen Vorschriften für die Laborsicherheit und gute Laborpraxis behandeln. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Nachfrage erhältlich. Wenden Sie sich an den technischen Support.
18. Befolgen Sie Ihre nationalen, regionalen und lokalen Verordnungen in Bezug auf die Abfallentsorgung.

ENTNAHME, HANDHABUNG UND LAGERUNG DER STUHLPROBEN

Akzeptable Probentypen
Frische Stuhlproben
Gefrorene Stuhlproben
Proben in Transportmedien (Cary Blair, C&S)

Nicht verwenden
Stuhlproben in Fixiermittel auf Formalinbasis (z.B. Natriumacetat-Formalin, Formalin 10%, Merthiolat-Formalin)
Stuhlproben in Fixiermittel auf Alkoholbasis (z.B. Polyvinylalkohol)

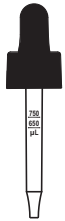
Probenlagerung Temperatur	Akzeptable Lagerdauer	Anmerkungen
2° C – 8° C	72 Stunden	Optimal sind Proben, die weniger als 24 Stunden alt sind.
Gefroren bei ≤ -10° C	Länger als 72 Stunden	Bei Raumtemperatur auftauen. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen kann zu einem Aktivitätsverlust aufgrund von Toxinverfall führen.

1. Für die Entnahme und Handhabung von Stuhlproben sind die üblichen Labormethoden geeignet.
2. Für die Entnahme der Stuhlproben sind saubere, dichte Behälter zu verwenden.
3. Stuhlproben sollten NICHT im *Verdünnungspuffer*gelagert werden.
4. Lassen Sie die Stuhlproben nie länger als 24 Stunden in der *Verdünnungspuffer*/*Konjugat*-Mischung.

VORBEREITUNG DER PROBEN

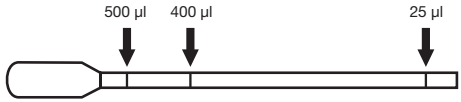
1. Lassen Sie alle Reagenzien und die erforderliche Anzahl von Testkarten vor der Verwendung Raumtemperatur annehmen. Es empfiehlt sich, die Reagenzien aus dem Schaumstoffeinsatz zu nehmen, um die Aufwärmzeit zu verkürzen.
2. Benutzen Sie für jede Stuhlprobe und zusätzliche externe Kontrolle ein eigenes kleines Reagenzglas und beschriften Sie es.
3. Geben Sie mithilfe des graduierten schwarzen Tropfers 750 µl (2. Markierung von der Spitze weg) *Verdünnungspuffer* in jedes Stuhlproben-Reagenzglas. **Bei Proben in Transportmedien wie Cary Blair oder C&S geben Sie 650 µl *Verdünnungspuffer* (1. Markierung von der Spitze weg) in das Reagenzglas.**

Probentyp	Menge *Verdünnungspuffer*
Frische Stuhlproben	750 µl (2. Markierung von der Spitze weg)
Gefrorene Stuhlproben (gefroren unverdünnt)	750 µl (2. Markierung von der Spitze weg)
Proben in Transportmedien (Cary Blair, C&S)	650 µl (1. Markierung von der Spitze weg)
Externe Kontrollen (positive und negative)	750 µl (2. Markierung von der Spitze weg)



4. Fügen Sie jedem Reagenzglas einen Tropfen *Konjugat* (Flasche mit rotem Verschluss) hinzu.
5. Verwenden Sie eine Einweg-Kunststoffpipette (im Lieferumfang enthalten) für jede Probe – die Pipetten sind bei 25 µl, 400 µl und 500 µl graduiert.

Graduierte Transferpipette:

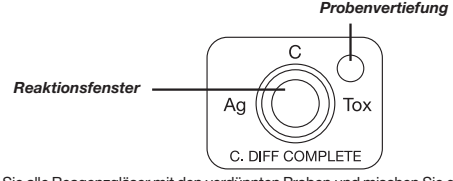


6. **Mischen Sie alle Proben unabhängig von ihrer Konsistenz gründlich durch – eine gleichmäßige Suspension der Proben vor dem Übertragen ist unbedingt erforderlich.**
   Flüssige/Halbfeste Proben – Pipettieren Sie 25 µl Probe mit einer Transferpipette und dispensieren Sie die Probenmenge in die *Verdünnungspuffer/Konjugat*-Mischung. Verwenden Sie dieselbe Transferpipette zum Mischen der verdünnten Probe.
   Geformte/Feste Stuhlproben – Achten Sie genau darauf, dass Sie der Probenmischung die korrekte Stuhlmenge beifügen. Mischen Sie die Probe gründlich mithilfe eines Holzstäbchens durch und übertragen Sie eine kleine Probenmenge (ca. 2 mm Durchmesser, entspricht der Menge von 25 µl) in die Verdünnungspuffer/Konjugat-Mischung. Emulgieren Sie die Probe mit dem Applikatorstäbchen.
   Proben in Cary Blair oder C&S -Transportmedien - Pipettieren Sie 100 µl (2 Tropfen aus der Transferpipette) Probe in die *Verdünnungspuffer/Konjugat*-Mischung.
7. **Optionale externe Kontrollproben:**
   Externe positive Kontrolle– Geben Sie einen Tropfen *positive Kontrolle* (Flasche mit grauem Verschluss) in die *Verdünnungspuffer/Konjugat*-Mischung.
   Externe negative Kontrolle– Geben Sie 25 µl *Verdünnungspuffer* in die *Verdünnungspuffer/Konjugat*-Mischung.

BITTE BEACHTEN: Ist die übertragene Probenmenge zu gering oder wird die Probe in der Verdünnungspuffer/Konjugat-Mischung nicht ausreichend gemischt und vollständig suspendiert, kann dies zu einem falsch-negativen Testergebnis führen. Eine zu große Probenmenge kann aufgrund des beeinträchtigten Probenflusses zu ungültigen Ergebnissen führen.

TESTVERFAHREN

1. Nehmen Sie eine *Testkarte* pro Probe und eine Testkarte für die zusätzliche externe positive oder negative Kontrolle (optional) zur Hand. Die Folienbeutel mit den Testkarten müssen dem Öffnen auf Raumtemperatur gebracht werden. Verwenden Sie die Testkarte sofort nach dem Öffnen. Beschriften Sie jede Karte ordnungemäß und legen Sie diese so auf eine flache Oberfläche, dass sich der Aufdruck „C. DIFF COMPLETE“ unten auf der Karte und die kleine Probenvertiefung in der rechten oberen Ecke der Karte befinden.



2. Verschließen Sie alle Reagenzgläser mit den verdünnten Proben und mischen Sie gründlich. Gründliches Mischen erzielen Sie mittels Vortexen oder Umdrehen des Reagenzglases. Nach der Verdünnung einer Patientenprobe oder *positiven Kontrolle* in der *Verdünnungspuffer/Konjugat-Mischung* kann diese bei Raumtemperatur für eine beliebig lange Zeitdauer bis max. 24 Stunden vor dem Übertragen auf die *Testkarte* inkubiert werden.
3. Mithilfe einer neuen Transferpipette übertragen Sie 500 µl der verdünnten Proben-Konjugat-Mischung in die ***Probenvertiefung*** (kleineres Loch in der oberen rechten Ecke der Karte) einer *Testkarte*. Stellen Sie dabei sicher, dass die flüssige Probe auf das Wicking-Pad im Inneren der *Testkarte* gelangt. Stellen Sie beim Übertragen der Probe in die Probenvertiefung sicher, dass die Spitze der Transferpipette auf das *Reaktionsfester* zeigt (größeres Loch in der Mitte der Testkarte).
4. Inkubieren Sie die Testkarte 15 Minuten bei Raumtemperatur – die Probe sickert durch die Karte und eine Feuchtstelle breitet sich im *Reaktionsfenster aus*.
   HINWEIS FÜR PROBEN, DIE NICHT MIGRIEREN:
   Gelegentlich migriert eine verdünnte Probe nicht richtig und das Reaktionsfenster wird nicht vollständig befeuchtet. Wenn das Reaktionsfenster nicht innerhalb von 5 Minuten nach dem Hinzufügen der Probe in die Probenvertiefung vollständig feucht erscheint, geben Sie 100 µl (4 Tropfen) Verdünnungspuffer in die Probenvertiefung und warten weitere 5 Minuten (insgesamt 20 Minuten lang).
5. Nach der Inkubation geben Sie 300 µl *Waschpuffer* in das ***Reaktionsfenster***. Verwenden Sie dazu den graduierten weißen Tropfer. Warten Sie, bis der *Waschpuffer* durch die Membran des Reaktionsfensters geflossen und vollständig absorbiert ist.
6. Fügen Sie dem ***Reaktionsfenster*** 2 Tropfen *Substrat* (Flasche mit weißem Verschluss) bei. Ergebnisse nach 10 Minuten visuell ablesen und aufzeichnen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

1. Die Auswertung des Tests ist am verlässlichsten, wenn die Ergebnisse sofort nach Ende der zehnminütigen Reaktionszeit abgelesen werden. Lesen Sie die Testkarte bei normalem Arbeitsabstand und in einer gut beleuchteten Umgebung ab. Folgen Sie einer Sichtlinie direkt über der Testkarte.
2. Prüfen Sie, ob in der Mitte des *Reaktionsfensters* blaue Punkte, die sogenannte interne positive Kontrolle, sichtbar sind. Das Erscheinen einer gepunkteten Kontrolllinie gilt als gültige interne Kontrolle. Der Hintergrund erscheint weiß bis hellblau. Prüfen Sie, ob blaue Linien auf den „Ag“- und „Tox“-Seiten des *Reaktionsfensters*, die sogenannten Testlinien, sichtbar sind. Die Farbintensität der Linien kann schwach bis stark sein.
3. **Positives Ergebnis für Antigen („Ag“):** Ein positives Antigen-Ergebnis kann innerhalb des Zeitraums zwischen der Beigabe des *Substrats* und der 10-minütigen Ablesezeit ausgewertet werden. Ein positives Antigen-Ergebnis weist eine sichtbare blaue „Ag“-Linie und eine sichtbare gepunktete blaue Kontrolllinie unter dem „C“ auf (Abb. 1a). Die Farbintensität der Linien kann schwach bis stark sein. Eine deutlich sichtbare Teillinie gilt als positives Ergebnis. Interpretieren Sie eine Membranverfärbung nicht als positives Ergebnis. Ein positives Ergebnis zeigt an, dass *C. difficile* vorhanden ist.
4. **Positives Ergebnis für Antigen und Toxin („Tox“):** Gehen Sie im Falle eines positiven Antigen-Ergebnisses (d. h. eine blaue „Ag“-Linie und eine gepunktete blaue Kontrolllinie unter dem „C“ sind sichtbar) zur Auswertung des Toxin-Ergebnisses über. Ein positives Ergebnis kann innerhalb des Zeitraums zwischen der Beigabe des *Substrats* und der 10-minütigen Ablesezeit interpretiert werden. Ein positives Toxin-Ergebnis weist eine sichtbare blaue „Tox“-Linie auf (Abb. 1b). Die Farbintensität der Linie kann schwach bis stark sein. Eine deutliche Teillinie gilt als positives Ergebnis. Interpretieren Sie eine Membranverfärbung nicht als positives Ergebnis. Ein positives Ergebnis zeigt an, dass *C. difficile*-Toxin vorhanden ist.
5. **Negatives Ergebnis:** Ein Test kann erst frühestens 10 Minuten nach der Beigabe des *Substrats* als negativ oder ungültig interpretiert werden. Eine einzelne blaue gepunktete Linie ist in der Mitte des *Reaktionsfensters* unter dem „C“ sichtbar und es sind keine Testlinien auf der „Ag“- bzw. „Tox“-Seite des *Reaktionsfensters* sichtbar (Abb. 1c). Ein negatives Ergebnis im Antigenbereich zeigt an, dass entweder kein *C. difficile*-Antigen in der Probe vorhanden ist oder der Wert unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt. Ein negatives Ergebnis im Toxinbereich zeigt an, dass entweder kein C. difficile-Toxin in der Probe vorhanden ist oder der Wert unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt.
6. **Ungültiges Ergebnis:** Es sind keine Linien im Reaktionsfester sichtbar (Abb. 1d). Das Testergebnis ist ungültig, wenn nach abgeschlossener Reaktion keine blaue gepunktete Linie unter dem „C“ sichtbar ist (Abb. 1e, 1f, 1g).
7. **Negatives Ergebnis für Antigen („Ag“), positives Ergebnis für Toxin („Tox“):** Ein geringer Probenanteil liefert möglicherweise ein negatives Ergebnis für Antigen und positives Ergebnis für Toxin. Diese Proben gelten als unbestimmt und müssen mit einer neuen Stuhlprobe nochmals getestet werden (Abb. 1h). Wenn die Probe wiederholt negativ für Antigen, jedoch positiv für Toxin ist, so ist dies als positives Toxinergebnis zu verzeichnen.

ABBILDUNG 1: *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

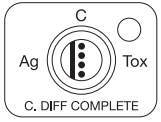


Abbildung 1a
Positives Antigen-Ergebnis

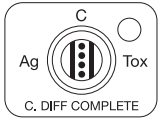


Abbildung 1b
Positives Antigen- und Toxin-Ergebnis

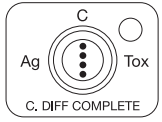


Abbildung 1c
Negatives Ergebnis

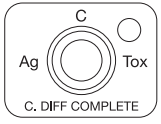


Abbildung 1d
Ungültiges Ergebnis

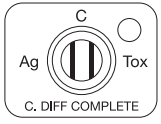


Abbildung 1e
Ungültiges Ergebnis

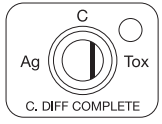


Abbildung 1f
Ungültiges Ergebnis

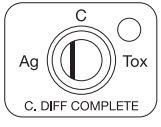


Abbildung 1g
Ungültiges Ergebnis

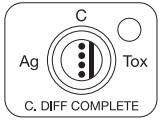


Abbildung 1h
Siehe Nr. 7 für Auswertung

QUALITÄTSKONTROLLE

Intern: Auf jeder *Testkarte* muss nach dem Test eine gepunktete blaue Linie in der Mitte des *Reaktionsfensters* unter dem „C" sichtbar sein. Die blaue gepunktete Kontrolllinie bestätigt, dass Probe und Reagenzien korrekt zugegeben wurden, die Reagenzien während des Testverlaufs aktiv waren und eine korrekte Probenmigration durch die *Testkarte* stattgefunden hat. Sie bestätigt zudem die Reaktivität der anderen Reagenzien des Tests. Ein farbloser Hintergrund im Ergebnisbereich gilt als interne negative Kontrolle. Bei korrekt durchgeführtem Test und ordnungsgemäßer Funktion der Reagenzien ist der Hintergrund weiß, um ein erkennbares Ergebnis zu liefern.
Extern: Die Reaktivität des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Kits muss bei Erhalt anhand der *positiven Kontrolle* und der negativen Kontrolle (*Verdünnungspuffer*) überprüft werden. Die *positive Kontrolle* ist im Kit enthalten (Flasche mit grauem Verschluss). Die *positive Kontrolle* dient zur Überprüfung der Reaktivität der anderen Testreagenzien und ist nicht zur Bestätigung der Verlässlichkeit beim analytischen Cut-off des Tests bestimmt. Als negative Kontrolle wird der *Verdünnungspuffer* verwendet. Es können auch weitere Tests mit den Kontrollen durchgeführt werden, um die Anforderungen lokaler, landes- und/oder bundesweiter Vorschriften und/oder von Zertifizierungsbehörden zu erfüllen.

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Der *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Test dient zum Nachweis von C. difficile-Antigen und Toxin(en) in Stuhlproben. Der Test bestätigt das Vorhandensein von Toxin im Stuhl. Diese Information muss vom Arzt angesichts der Krankengeschichte und körperlichen Untersuchung des Patienten interpretiert werden. Der *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®Test weist Toxin A bei Konzentrationen von ≥0,63 ng/ml, Toxin B bei Konzentrationen von ≥0,16 ng/ml und Glutamatdehydrogenase bei Konzentrationen von ≥0,8 ng/ml nach.
2. Stuhlproben sind überaus komplex. Optimale Ergebnisse werden beim *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Test mit Proben erzielt, die weniger als 24 Stunden alt sind. Die meisten unverdünnten Proben können bei 2° C - 8° C für 72 Stunden gelagert werden, bevor ein deutlicher Toxinverfall beobachtet wird. Wenn die Proben nicht innerhalb dieses Zeitraums getestet werden, können sie eingefroren und später wieder aufgetaut werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen kann allerdings zu verminderter Immunreaktivität des Antigens und der Toxine A und B führen.
3. Einige Proben können schwach reagieren. Dies kann auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden, wie etwa geringe Antigen- und/oder Toxinkonzentration, das Vorhandensein bindender Substanzen oder inaktivierender Enzyme im Stuhl. Die Farbintensität der Linien kann schwach bis stark sein. Diese Proben sind als positiv aufzuzeichnen, wenn eine blaue Linie oder blaue Teillinie beobachtet wird. Eine deutliche Teillinie gilt als positives Ergebnis.
4. Stuhlproben, die in 10 % Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol konserviert wurden, dürfen nicht verwendet werden.
5. Der *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Test ist qualitativ. Die Farbintensität darf nicht quantitativ interpretiert werden.
6. Einige Isolate von *C. sordellii* reagieren möglicherweise im *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Test, da sie immunologisch verwandte Toxine produzieren (1).
7. Bei Kleinkindern wurden Kolonisationsraten von bis zu 50 % beobachtet. Auch bei Mukoviszidose-Patienten wurde eine hohe Rate beobachtet (1,3). In diesen Gruppen können positive Ergebnisse auftreten, es sollte jedoch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass es sich um einen kolonisierten Träger handelt.
8. Der einzige nicht-*C. difficile*-Organismus, der im Toxinbereich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Tests reagierte, war *Clostridium sordellii* VPI 9048. Dieser Stamm produziert HT- und LT-Toxine, die Toxin A bzw. Toxin B entsprechen.
9. Es liegen keine Daten zur Wirkung von Darmspülungen, Bariumeinläufen, Laxativen oder Darmpräparationen auf die Leistung des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Tests vor. Alle diese Verfahren können zu einer signifikanten Verdünnung oder dem Vorhandensein von Zusatzstoffen führen, die sich auf die Testleistung auswirken.

ERWARTUNGSWERTE

Clostridium difficile-Erkrankungen treten vor allem als nosokomiale Infektionen bei älteren Patienten auf. Die Häufigkeit hängt dabei von Faktoren wie der Patientenpopulation, Art der Anstalt und der Epidemiologie ab. *C. difficile*-Erkrankungen bei Patienten mit antibiotikabedingter Diarrhoe wurden mit einer Häufigkeit von 5-20 % festgestellt, Krankenhäuser können aber auch geringere oder höhere Raten aufweisen. Die Testergebnisse müssen stets gemeinsam mit klinischen Symptomen interpretiert werden, denn einige gesunde Erwachsene sowie viele gesunde Kleinkinder (bis zu 50 %) liefern ein positives Testergebnis für *C. difficile*-Toxin. Zudem wurde bei Mukoviszidose-Patienten eine *C. difficile*-Trägerrate von 22 - 32 % festgestellt (1,3). In den zu diesem Test durchgeführten Studien mit symptomatischen Patienten wurden Toxin A und B mit einer Häufigkeit von 12% und GLDH mit einer Häufigkeit von 18% festgestellt. Ein positives Ergebnis im Antigenbereich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Tests bestätigt, dass *C. difficile* in einer Stuhlprobe vorhanden ist; ein negatives Ergebnis zeigt an, dass der Organismus nicht vorhanden ist. Ein positives Ergebnis im Toxinbereich des *C.*

DIFF QUIK CHEK COMPLETE® bestätigt, dass *C. difficile*-Toxin in einer Stuhlprobe vorhanden ist; ein negatives Ergebnis zeigt an, dass entweder kein Toxin vorhanden ist oder die Toxinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt.

LEISTUNGSDATEN

Klinische Beurteilung des Antigenbereichs des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* Tests

Der Antigenbereich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* Tests wurde mit Bakterienkultur verglichen. Die dabei untersuchten Proben wurden für Routinetests in die klinischen Labors eingesandt. Die Bakterienkultur wurde nach internen Verfahren durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Zusammenfassung der klinischen Leistung beim Vergleich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* Tests mit Bakterienkultur

Az = 1126	Bakterienkultur Positiv	Bakterienkultur Negativ
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinie positiv	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinie negativ	21	842

		95%-Konfidenzgrenzen
Sensitivität	90,5%	85,7 – 93,9
Spezifität	93,1%	91,2 – 94,7
Positiver Vorhersagewert	76,4%	70,7 – 81,3
Negativer Vorhersagewert	97,6%	96,2 – 98,4
Korrelation	92,6%	91,8 – 93,4

Abweichende Proben wurden unter Verwendung gängiger ELISA-Tests für den Nachweis von *C. difficile*-Glutamatdehydrogenase beurteilt.
29 der 62 falsch-positiven Proben lieferten bei einem weiteren GLDH-Test ein positives Ergebnis und wurden als echt positiv betrachtet.
13 der 21 falsch-negativen Proben lieferten bei einem weiteren GLDH-Test ein negatives Ergebnis und wurden als echt negativ betrachtet.

Der Antigenbereich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* Tests wurde mit Gewebekultur für den Nachweis von C. difficile-Toxin verglichen. Die dabei untersuchten Proben wurden für Routinetests in die klinischen Labors eingesandt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Der Antigenbereich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* Tests wies 98,7% der mit Gewebekultur positiven Proben nach.

Tabelle 2. Zusammenfassung der klinischen Leistung beim Vergleich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* Tests mit Gewebekultur

Az = 1126	Gewebekultur Positiv	Gewebekultur Negativ
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinie positiv	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinie negativ	2	861

Klinische Beurteilung des Toxinbereichs des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* Tests

Der Toxinbereich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* Tests wurde mit Gewebekultur in zwei klinischen Labors sowie intern bei TECHLAB®, Inc verglichen. Die dabei untersuchten Proben wurden für Routinetests in die klinischen Labors eingesandt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. Zusammenfassung der klinischen Leistung beim Vergleich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* Tests mit Gewebekultur

Az = 1126	Gewebekultur Positiv	Gewebekultur Negativ
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxinlinie positiv	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxinlinie negativ	19	964

		95%-Konfidenzgrenzen
Sensitivität	87,8%	81,4 - 92,3
Spezifität	99,4%	98,6 - 99,7
Positiver Vorhersagewert	95,8%	90,7 - 98,3
Negativer Vorhersagewert	98,1%	96,9 - 98,8
Korrelation	97,8%	97,6 - 98,0

Abweichende Proben wurden unter Verwendung gängiger ELISA-Tests für den Nachweis von Toxin A und B beurteilt.
5 der 6 falsch-positiven Proben lieferten beim ELISA ein positives Ergebnis und wurden als echt positiv betrachtet.
12 der 19 falsch-negativen Proben lieferten beim ELISA ein negatives Ergebnis und wurden als echt negativ betrachtet.

AUSWIRKUNGEN DER STUHLKONSISTENZ

Auswirkungen der Stuhlkonsistenz auf den *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Test

Die Reaktionen der Stuhlproben unterschiedlicher Konsistenz im Antigenbereich (Az. =978) und Toxinbereich (Az. =981) des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Tests sind in Tabelle 4 und 5 dargestellt. Der Prozentsatz an positiven Reaktionen bei Gewebekultur bzw. dem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Test war bei allen drei Stuhlprobentypen (flüssig, halbfest und fest) ähnlich. Alle Proben wurden zum Testen auf C. difficile eingesandt. Ob eine Probe getestet wurde oder nicht, hing von der Krankengeschichte des Patienten, nicht von der Probenkonsistenz ab. Die Ergebnisse des Antigenbereichs zeigen, dass der *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Test und Bakterienkultur beim Testen von Proben mit unterschiedlicher Konsistenz eine ähnliche Leistung erbrachten. Die Ergebnisse des Toxinbereichs zeigen, dass der *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Test und Gewebekultur beim Testen von Proben mit unterschiedlicher Konsistenz eine ähnliche Leistung erbrachten.

Tabelle 4. Reaktion von Stuhlproben unterschiedlicher Konsistenz im Antigenbereich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Tests

Anzahl der Proben (Az = 978)	Flüssige Proben (Az = 335)	Halbfeste Proben (Az = 522)	Feste Proben (Az = 121)
Positiv bei Bakterienkultur	59 (17,6%)	110 (21,1%)	19 (15,7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinie positiv	72 (21,5%)	128 (24,5%)	25 (20,7%)
Negativ bei Bakterienkultur	276 (82,4%)	412 (78,9%)	102 (84,3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinie negativ	263 (78,5%)	394 (75,5%)	96 (79,3%)

Tabelle 5. Reaktion von Stuhlproben unterschiedlicher Konsistenz im Toxinbereich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Tests

Anzahl der Proben (Az = 981)	Flüssige Proben (Az = 336)	Halbfeste Proben (Az = 523)	Feste Proben (Az = 122)
Positiv bei Gewebekultur	43 (12,8%)	81 (15,5%)	8 (6,6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxinlinie positiv	42 (12,5%)	72 (13,8%)	7 (5,7%)
Negativ bei Gewebekultur	293 (87,2%)	442 (84,5%)	114 (93,4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxinlinie negativ	294 (87,5%)	451 (86,2%)	115 (94,3%)

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Der Cut-off für den Test wurde bei einer Konzentration von 0,63 ng/ml für Toxin A, 0,16 ng/ml für Toxin B und 0,8 ng/ml für Glutamatdehydrogenase bestimmt.

REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Tests wurde anhand von 12 Stuhlproben bestimmt, die zur Verhinderung ihrer Identifizierung während des Tests kodiert wurden. Die Tests wurden in 3 unabhängigen Labors an 3 Tagen durchgeführt. Die Proben lieferten zu 100 % die erwarteten Ergebnisse.

KREUZREAKTIVITÄT

Mit folgenden Mikroorganismen (bis zu einer Endkonzentration von ca. 10^8 oder mehr Organismen/ml) beimpfte Stuhlproben zeigten im Antigen- bzw. Toxinbereich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Tests keine Reaktion:

Bakterium bzw. Erreger: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (nicht toxigen), *Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans), *Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

Der einzige nicht-*C. difficile*-Organismus, der im Toxinbereich des *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Test reagierte, war *Clostridium sordellii* VPI 9048. Dieser Stamm produziert HT- und LT-Toxine, die Toxin A bzw. Toxin B entsprechen.

Folgende Viren ($10^{3.3}$ - $10^{8.25}$ TCID-Einheiten / 0,2 ml) zeigten im *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Test keine Reaktion:

Viren: Adenoviren 1,2,3,5,40,41, humaner Coronavirus, Coxsackievirus B2,B3,B4,B5, Echovirus 9,11,18,22,33, Enteroviren 68,69,70,71, Rotavirus.

STÖRSUBSTANZEN

Folgende Substanzen (US-Formulierung) wirkten sich, wenn in den angegebenen Konzentrationen im Stuhl vorhanden, nicht auf die Testergebnisse aus: Mucin (3,5% w/v), humanes Blut (40% v/v), Bariumsulfat (5% w/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), Stearinsäure/Palmitinsäure (40% w/v), Metronidazol (0,25% w/v), Vancomycin (0,25% w/v).

REAKTION KLINISCHER ISOLATE AUF CYCLOSERIN-CEFOXITIN-FRUKTOSE-AGAR (CCFA)

Insgesamt wurden 103 aus anaerober Bakterienkultur auf CCFA nach 3 Tagen bei 37° C gewonnene klinische *C. difficile*-Isolate mit dem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® Test getestet. Für die Untersuchung wurden einzelne Kolonien ausgewählt und in *Verdünnungspuffer* gemäß Empfehlungen für Stuhlproben suspendiert. Alle 103 Isolate zeigten eine positive Antigenreaktion im Test.

70 der 103 Isolate (68%) stammten aus Stuhlproben, die mit Gewebekultur ein positives Ergebnis für *C. difficile*-Toxin lieferten. 56 (80%) von diesen zeigten beim Screening nach anaerobem Wachstum auf CCFA (3 Tage bei 37° C) eine positive Toxinreaktion.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

UTILISATION PRÉVUE

Le test TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* est un dosage immunoenzymatique membranaire rapide pour la détection simultanée de l'antigène glutamate déshydrogénase *Clostridium difficile* et des toxines A et B dans un puits à réaction simple. Ce test détecte l'antigène du *C. difficile*, le glutamate déshydrogénase, comme marqueur de la présence de *C. difficile* et confirme la présence de souches toxinogènes de *C. difficile* en dépistant la présence des toxines A et B dans les échantillons de selles chez les personnes suspectées de la maladie *C. difficile*. Le test doit être utilisé comme aide dans le diagnostic de la maladie *C. difficile*. Ses résultats doivent, comme pour tous les autres tests *C. difficile*, être évalués en tenant compte des antécédents du patient.

EXPLICATION

Après un traitement antibiotique, de nombreux patients développent des problèmes gastro-intestinaux pouvant aller d'une légère diarrhée à des colites pseudomembraneuses. De nombreuses formes légères de maladies gastro-intestinales et la plupart des cas de colites pseudomembraneuses sont dues à des souches toxinogènes de *Clostridium difficile* (1). Cet organisme est une bactérie anaérobie à germes opportunistes qui se développe dans l'intestin dès la modification de la flore normale par l'antibiotique. Les souches toxinogènes de *C. difficile* sont porteuses de gènes qui codent les toxines alors que les souches non toxinogènes ne sont pas porteuses de gènes de toxines. La pathologie se développe à partir des toxines produites par l'organisme toxinogène. Les symptômes cliniques associés à la maladie sont d'abord considérés comme étant dus à la toxine A, une entérotoxine qui endommage les tissus (2,3). Le *C. difficile* produit également une deuxième toxine appelée toxine B. Cette dernière, qui est considérée comme la cytotoxine de l'organisme, est détectée lors de l'essai par culture tissulaire actuellement utilisé dans de nombreux laboratoires. Les souches toxinogènes du *C. difficile* produisent les deux toxines ou uniquement la toxine B (4-7). Le glutamate déshydrogénase de *C. difficile* est un bon marqueur antigénique pour l'organisme qui se trouve dans les selles car il est produit en grosses quantités par toutes les souches, qu'elles soient toxinogènes ou non toxinogènes (8-10). L'antigène peut être détecté dans les échantillons de selles via le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Un résultat positif au test, spécifique à la glutamate déshydrogénase de *C. difficile*, confirme la présence de cet organisme dans les selles. Un résultat négatif indique l'absence de cet organisme. Le résultat positif au test portant sur les toxines A et B confirme la présence de souches toxinogènes de *C. difficile*.

PRINCIPE DU TEST

Le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* utilise des anticorps spécifiques à la glutamate déshydrogénase et aux toxines A et B de *C. difficile*. Le dispositif comporte une Fenêtre de réaction avec trois bandes verticales d'anticorps immobilisés. La bande d'antigène (« Ag ») comporte des anticorps contre la glutamate déshydrogénase de *C. difficile*. La bande de contrôle (« C ») est une bande en pointillés qui contient des anticorps anti-peroxydase de raifort (HRP). La bande de test pour les toxines A et B (« Tox ») contient des anticorps dirigés contre les toxines A et B de *C. difficile*. Le*Conjugué* est composé d'anticorps dirigés contre la glutamate déshydrogénase et contre les toxines A et B conjugués à la peroxydase de raifort. Pour réaliser le test, l'échantillon est ajouté à un tube contenant un mélange de *Diluant* et de *Conjugué*. Le mélange conjugué-échantillon dilué est placé dans le *Micropuits d'échantillon* et le dispositif est soumis à une période d'incubation de 15 minutes à température ambiante. Pendant l'incubation, la glutamate déshydrogénase et les toxines A et B éventuellement présentes dans l'échantillon se lient avec le conjugué peroxydase-anticorps. Les complexes conjugué-anticorps-antigènes migrent à travers un filtre vers une membrane où ils sont capturés par les anticorps immobilisés spécifiques à la glutamate déshydrogénase et aux toxines A et B sur la bandelette. La *Fenêtre de réaction* est ensuite lavée avec un *Tampon de lavage*. Un *Substrat* est ensuite ajouté. Au bout de 10 minutes d'incubation, la réaction « Ag » et l'apparition d'une ligne bleue verticale du côté « Ag » de la *Fenêtre de réaction* sont observées. Une ligne bleue indique un test positif. Si le test « Ag » est positif, la réaction « Tox » doit être observée pour constater si une ligne bleue est apparue dans la partie « Tox » de la *Fenêtre de réaction*. Une ligne bleue indique un test positif. Une réaction positive « C », indiquée par une ligne bleue verticale en pointillés, dans la zone de contrôle « C » de la *Fenêtre de réaction*, confirme que le test fonctionne correctement et que les résultats sont valides.

MATÉRIEL FOURNI

MEM | DEV — ***Dispositifs à membranes*** – un sachet contenant 1 dispositif

DIL | SPE — ***Diluant* (22 ml par flacon)** – Solution tamponnée et protéinée avec compte-gouttes gradué (contient du ProClin® 300 0,05 %)*

WASH | REAG — ***Tampon de lavage* (12 ml par flacon)** – Solution tamponnée avec compte-gouttes gradué (contient du ProClin® 300 0,05 %)*

SUBS | REAG — ***Substrat* (3,5 ml par flacon)** – Solution contenant du tétraméthylbenzidine

CONJ | ENZ — ***Conjugué* (2,5 ml par flacon)** – Anticorps monoclonal de souris spécifique à la glutamate déshydrogénase conjugué à la peroxydase de raifort et anticorps polyclonal de chèvre spécifique aux toxines A et B conjugué à la peroxydase de raifort dans une solution tamponnée de protéines (contient du ProClin® 300 0,05 %)*

CONTROL | + — ***Contrôle positif* (2 ml)** – Antigène dans une solution tamponnée et protéinée

Pipettes de transfert jetables en plastique – graduées de 25 µL, 400 µL et 500 µL

IVD — Pour une utilisation diagnostique *in vitro*

*Mot indicateur : Avertissement
H317 : Risque de réactions cutanées allergiques
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Petits tubes à essai (par exemple des tubes en plastique ou en verre Eppendorf)
Écouvillons — *Minuterie* — *Agitateur vortex*
Gants jetables pour manipuler les échantillons de selles — *Pipeteur et embouts*

DURÉE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'expiration du kit est indiquée sur l'étiquette. La date d'expiration de chaque composant est indiquée sur chaque étiquette. Le kit doit être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C.

PRÉCAUTIONS À PRENDRE

1. Les réactifs des différents kits ne doivent pas être mélangés ou échangés. Ne pas utiliser de kit dont la date d'expiration est dépassée.
2. Contrôler tous les éléments du kit afin de vérifier qu'ils ne présentent aucune fuite. Examiner le kit dès la réception afin de vérifier que les éléments ne sont ni congelés ni chauds au toucher en raison de conditions de transports inadéquates.
3. Placer tous les composants à TEMPÉRATURE AMBIANTE AVANT UTILISATION !
4. Les capsules, les embouts et les compte-gouttes sont classés par couleur. Ne PAS les mélanger !
5. Ne pas congeler les réactifs. Le kit doit être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C.
6. Le sachet contenant le *Dispositif à membrane* doit être à température ambiante avant ouverture. Maintenir les dispositifs à membranes au sec avant de les utiliser.
7. Utiliser les échantillons de selles dans les 72 heures suivant le prélèvement, et ce afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles. Les échantillons congelés peuvent être moins actifs suite à la congélation et à la décongélation. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler à température ambiante.
8. Verser les réactifs en tenant les flacons verticalement de façon à instiller une goutte de taille adéquate et un volume qui convient.
9. Après leur utilisation, les échantillons et les dispositifs à membranes doivent être manipulés et jetés de la même façon que des matières présentant un danger biologique.
10. Les dispositifs à membranes ne peuvent pas être réutilisés.
11. Le test a été optimisé dans le sens de la sensibilité et de la spécificité. Toute modification de la procédure spécifiée et/ou des conditions de test peut altérer la sensibilité et la spécificité du test. Procéder conformément à la procédure spécifiée.
12. Vérifier la durée totale de l'analyse si plusieurs échantillons de selles sont testés. Ajouter d'abord le *Diluant* puis le *Conjugué* dans chaque tube de *Diluant*. Introduire ensuite l'échantillon dans le tube de *Diluant*/*Conjugué*. Mélanger soigneusement tous les échantillons dilués puis les transférer dans le *Dispositif à membrane*. L'étape d'incubation de 15 minutes commence dès que le dernier mélange conjugué-échantillon dilué est transféré sur le dernier *Dispositif à membrane*.
13. Si le *Substrat* prend une couleur bleu foncé/violet, appeler les services techniques pour procéder à un remplacement.
14. Les échantillons de selles peuvent contenir des agents potentiellement infectieux et doivent être manipulés selon le « Niveau de biosécurité 2 », comme le recommande le manuel du CDC/NIH, « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories ».
15. Tous les réactifs sont exclusivement réservés au diagnostic *in vitro*.
16. S'équiper de gants jetables pendant le test.
17. Les réactifs contiennent du ProClin® 300 0,05 % comme conservateur. Même si la concentration est faible, ProClin® 300 est connu pour sa nocivité. En cas d'irritation de la peau ou d'éruption cutanée, consulter un médecin. Les vêtements contaminés doivent être ôtés puis lavés avant d'être réutilisés. Manipuler les réactifs selon les réglementations existantes relatives à la sécurité des laboratoires et les bonnes pratiques de laboratoire. Les fiches de sécurité de ce produit sont disponibles à la demande. Contacter le support technique.
18. Respecter les arrêtés locaux, régionaux et nationaux relatifs aux réglementations sur l'élimination des déchets.

PRÉLÈVEMENT, MANIPULATION ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

Types d'échantillons acceptables
Échantillons de selles frais
Échantillons de selles congelés
Échantillons dans un milieu de transport (Cary Blair, C&S)

Ne pas utiliser
Échantillons de selles fixés au formol (par ex. formole à base d'acétate de sodium, formol à 10 %, formol thimérosal)
Échantillons de selles fixés à l'alcool (par ex. alcool de polyvinyle)

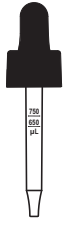
Entreposage d'échantillons Température	Longueur de stockage acceptable	Commentaires
2-8 °C	72 heures	Dans l'idéal, les prélèvements doivent avoir moins de 24 heures
Congelés à ≤ -10 °C	Plus de 72 heures	Décongélation à température ambiante. La multiplication des congélations et décongélations peut entraîner une perte d'activité de l'échantillon suite à une dégradation des toxines.

1. Les procédures standard utilisées sur place pour le prélèvement et la manipulation des échantillons de selles sont appropriées.
2. Les échantillons de selles doivent être prélevés dans des conteneurs propres et étanches.
3. Le stockage des échantillons de selles dans le *Diluant* est déconseillé.
4. Ne pas laisser les échantillons de selles dans le mélange *Diluant*/*Conjugué* pendant une période supérieure à 24 heures.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

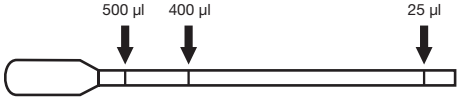
1. Placer tous les réactifs et le nombre de dispositifs nécessaires à température ambiante avant de les utiliser. Il est recommandé d'éliminer les réactifs du coussin en mousse afin de réduire le temps nécessaire au réchauffement à température ambiante.
2. Préparer et étiqueter un petit tube à essai pour chaque échantillon et pour chaque contrôle supplémentaire externe.
3. À l'aide du compte-gouttes gradué noir, ajouter 750 µl (2ème graduation depuis l'extrémité) de *Diluant* dans chaque tube d'échantillon de selles. **Pour les échantillons provenant d'un milieu de transport tel qu'un Cary Blair ou un C&S, ajouter 650 µl (1ère graduation depuis l'extrémité) de *Diluant* dans le tube.**

Type d'échantillon	Volume de *Diluant*
Échantillons de selles frais	750 µl (2ème graduation depuis l'extrémité)
Échantillon de selles congelé (non dilué)	750 µl (2ème graduation depuis l'extrémité)
Échantillons dans un milieu de transport (Cary Blair, C&S)	650 µL (1ère graduation depuis l'extrémité)
Contrôles externes (positifs et négatifs)	750 µl (2ème graduation depuis l'extrémité)



4. Ajouter une goutte de *Conjugué* (bouteille à capsule rouge) dans chaque tube.
5. Prendre une pipette de transfert jetable en plastique (fournie avec le kit) pour chaque échantillon – les pipettes présentent des graduations en relief à 25 µl, 400 µl et 500 µl.

Pipette de transfert graduée :

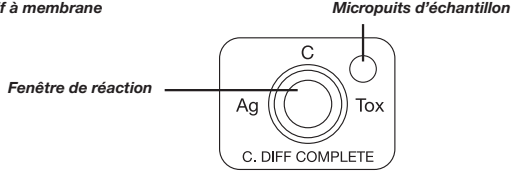


6. **Mélanger complètement tous les échantillons indépendamment de leur consistance. Les échantillons doivent tous être parfaitement suspendus avant le transfert.**
   Échantillons liquides ou semi-solides – Prélever 25 µl d'échantillon avec une pipette de transfert puis verser l'échantillon dans le mélange de *Diluant/Conjugué*. Utiliser la même pipette de transfert pour mélanger l'échantillon dilué.
   Échantillons moulés ou solides – Veiller à ajouter la quantité adéquate d'échantillons de selles au mélange témoin. Mélanger complètement l'échantillon à l'aide d'un écouvillon en bois et transférer un petit fragment (de 2 mm de diamètre environ, équivalent à 25 µl) de l'échantillon dans le mélange Diluant/Conjugué. Émulsionner l'échantillon à l'aide de l'écouvillon.
   Échantillons de selles provenant d'un milieu de transport tel qu'un Cary Blair ou un C&S – Prélever 100 µl (2 gouttes de la pipette de transfert) d'échantillon et les introduire dans le mélange *Diluant/Conjugué*.
7. **Échantillons témoins externes facultatifs :**
   Contrôle externe positif - Ajouter une goutte de *Contrôle positif* (bouteille à capsule grise) dans le mélange *Diluant/Conjugué*.
   Contrôle externe négatif - Ajouter 25 µL de *Diluant* dans le mélange *Diluant/Conjugué*.

REMARQUE : si le fragment transféré est trop petit, si le mélange est défectueux ou si l'échantillon n'est pas complètement suspendu dans le mélange Diluant/Conjugué, les résultats obtenus peuvent se révéler faussement négatifs. Une trop grande quantité de selles peut donner des résultats nuls à cause du débit limité.

PROCÉDURE DE TEST

1. Prendre un *Dispositif à membrane* par échantillon et un dispositif par contrôle externe facultatif positif ou négatif. Les sachets en aluminium contenant les dispositifs doivent être portés à température ambiante avant ouverture. Utiliser le dispositif immédiatement après ouverture. Étiqueter correctement chaque dispositif et l'orienter sur une surface plane de sorte que la mention « C. DIFF COMPLETE » se trouve en bas et que le Micropuits d'échantillon se trouve dans l'angle supérieur droit du dispositif.



2. Fermer chaque tube d'échantillon dilué et mélanger complètement. Pour obtenir un mélange approprié, procéder par mixage ou agitation du tube. Dès qu'un échantillon de patient ou un *Contrôle positif* a été dilué dans le mélange *Diluant/Conjugué*, il peut être incubé à température ambiante jusqu'à 24 heures avant d'être ajouté au *Dispositif à membrane*.
3. À l'aide d'une pipette de transfert neuve, transférer 500 µl du mélange échantillon-conjugué dilué dans le ***Micropuits d'échantillon*** (petite cavité située dans l'angle supérieur droit du dispositif) d'un *Dispositif à membrane*, en veillant à bien expulser l'échantillon liquide sur la garniture perméable située à l'intérieur du *Dispositif à membrane*. Lors de l'introduction de l'échantillon dans le micropuits, veiller à ce que l'extrémité de la pipette de transfert soit inclinée vers la *Fenêtre de réaction* (grande cavité au centre du dispositif).
4. Laisser incuber le dispositif à température ambiante pendant 15 minutes – l'échantillon sera absorbé par le dispositif et une zone humide apparaîtra dans la *Fenêtre de réaction*.
   NOTE CONCERNANT LES ÉCHANTILLONS NE MIGRANT PAS :
   L'échantillon dilué ne parvient pas toujours à migrer correctement ; la Fenêtre de réaction n'est alors que partiellement humidifiée. Si la Fenêtre de réaction ne semble pas complètement humidifiée dans les 5 minutes suivant l'ajout de l'échantillon dans le Micropuits d'échantillon, ajouter 100 µl (4 gouttes) de Diluant dans le Micropuits d'échantillon, puis attendre 5 minutes supplémentaires (soit 20 minutes au total).
5. Après incubation, ajouter 300 µl de *Tampon de lavage* à l'aide du compte-gouttes blanc gradué dans la ***Fenêtre de réaction***. Laisser le *Tampon de lavage* pénétrer la Fenêtre de réaction et veiller à ce qu'il soit complètement absorbé.
6. Verser 2 gouttes de *Substrat* (bouteille à capsule blanche) dans la ***Fenêtre de réaction***. Lire et consigner les résultats visuels observés au bout de 10 minutes.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. L'interprétation du test est plus fiable lorsque le dispositif est lu immédiatement à la fin de la période de réaction de 10 minutes. Lire le dispositif à une distance normale dans une pièce bien éclairée en regardant directement le dessus du dispositif à la verticale.
2. Observer si une ligne en pointillés bleue apparaît au centre de la *Fenêtre de réaction* : il s'agit du contrôle positif interne. L'aspect des bandes de contrôle représente un contrôle interne valide. Le fond peut apparaître blanc à bleu clair. Observer l'apparition de lignes bleues dans les zones « Ag » et « Tox » de la *Fenêtre de réaction* : ce sont les bandes de test. Les bandes peuvent présenter une couleur claire à foncée.
3. **Résultat positif pour l'antigène (« Ag ») :** un résultat positif pour l'antigène peut être interprété à tout moment entre l'adjonction de *Substrat* et le temps de lecture (10 minutes). Dans le cas d'un résultat positif pour l'antigène, la bande « Ag » bleue et la bande de contrôle bleue en pointillés sous le « C » doivent être visibles (Figure 1a). Les bandes peuvent présenter une couleur claire à foncée. Une ligne partielle évidente est interprétée comme un résultat positif. La décoloration de la membrane ne peut pas être interprétée comme un résultat positif. Un résultat positif indique la présence de *C. difficile*.
4. **Résultat positif pour l'antigène et la toxine (« Tox ») :** si le résultat pour l'antigène est positif (c'est-à-dire qu'une bande « Ag » bleue et une bande de contrôle bleue en pointillés sous « C » sont visibles), procéder à l'interprétation du résultat pour la toxine. Un résultat positif pour la toxine peut être interprété à tout moment entre l'adjonction de *Substrate* et le temps de lecture (10 minutes). Dans le cas d'un résultat positif pour la toxine, une bande « Tox » bleue est visible (Figure 1b). La bande peut présenter une couleur très claire à très foncée. Une ligne partielle évidente est interprétée comme résultat positif. La décoloration de la membrane ne peut pas être interprétée comme un résultat positif. Un résultat positif indique la présence de toxine *C. difficile*.
5. **Résultat négatif :** les tests ne peuvent pas être interprétés comme négatifs ou invalides moins de 10 minutes après l'adjonction du *Substrat*. Une seule ligne en pointillés bleue est visible au centre de la *Fenêtre de réaction*, sous le « C » et aucune bande de test n'est visible sur la zone « Ag » ou « Tox » de la *Fenêtre de réaction* (Figure 1c). Un résultat négatif dans la zone d'antigène indique

soit l'absence d'antigène *C. difficile* dans l'échantillon, soit un taux inférieur à la limite de détection du test. Un résultat négatif dans la zone de toxine indique soit l'absence de toxine C. difficile dans l'échantillon, soit un taux inférieur à la limite de détection du test.

6. **Résultat nul :** aucune bande n'est visible dans la Fenêtre de réaction (Figure 1d). Le résultat de test est nul si aucune bande en pointillés bleue n'est présente sous le « C » à la fin de la période de réaction (Figures 1e, 1f, 1g).
7. **Résultat négatif pour l'antigène (« Ag »), toxine positive (« Tox ») :** un faible pourcentage d'échantillons peut présenter des résultats négatifs pour l'antigène tout en étant positif pour la toxine. Ces échantillons doivent être considérés comme indéterminés et à nouveau testés avec des échantillons récents (Figure 1h). Si le nouveau test de l'échantillon est négatif pour l'antigène mais positif pour la toxine, consigner un résultat de toxine positif.

FIGURE 1 : INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU TEST *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

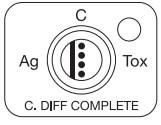


Figure 1a
Résultat positif pour l'antigène

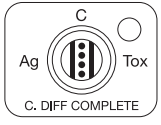


Figure 1b
Résultat positif pour l'antigène et la toxine

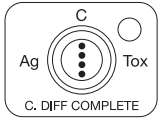


Figure 1c
Résultat négatif

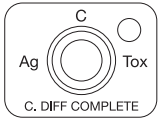


Figure 1d
Résultat nul

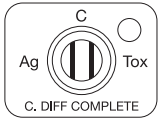


Figure 1e
Résultat nul

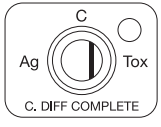


Figure 1f
Résultat nul

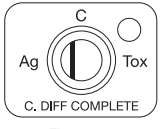


Figure 1g
Résultat nul

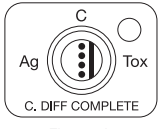


Figure 1h
Voir le point 7 pour l'interprétation

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Interne : une bande de contrôle en pointillés bleue doit être visible au centre de la *Fenêtre de réaction*, sous le « C », pour chaque *Dispositif à membrane* utilisé. L'apparition de la bande de contrôle en pointillés bleue confirme que l'échantillon et les réactifs ont été correctement ajoutés, que les réactifs étaient actifs au moment de la réalisation de l'essai et que l'échantillon a bien migré via le *Dispositif à membrane*. Il confirme la réactivité des autres réactifs associés au test. Un fond clair dans la zone résultat est considéré comme un contrôle interne négatif. Si le test a été réalisé correctement et les réactifs fonctionnent, le fond est blanc afin de fournir un résultat discernable.

Externe : la réactivité du kit *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® doit être contrôlée à la réception avec le *contrôle positif* et le contrôle négatif (*Diluant*). Le *Contrôle positif* est fourni avec le kit (bouteille à capsule grise). Le *Contrôle positif* permet de confirmer la réactivité des autres réactifs associés à l'essai mais il ne permet pas de garantir la précision à la limite de détection de l'essai analytique. Le *Diluant* est utilisé pour le contrôle négatif. Des tests supplémentaires peuvent être réalisés à l'aide des contrôles pour répondre aux exigences des réglementations locales, nationales et/ou fédérales et/ou des organismes d'accréditation.

LIMITES

1. Le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® est utilisé pour détecter l'antigène C. difficile et ses toxines dans des échantillons de selles. Le test confirme la présence de toxines dans les selles et ces informations doivent être examinées par le médecin avec le dossier médical du patient et l'examen physique de ce dernier. Le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® détecte les taux de toxine A ≥0,63 ng/ml, de toxine B ≥0,16 ng/ml et de glutamate déshydrogénase ≥0,8 ng/ml.
2. Les échantillons de selles sont extrêmement complexes. Le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® permet d'obtenir des résultats optimaux si les échantillons de selles ont été prélevés moins de 24 heures à l'avance. La plupart des échantillons non dilués peuvent être stockés à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant 72 heures avant qu'une dégradation significative de la toxine ne puisse être observée. Si les échantillons ne sont pas testés pendant cette période, ils peuvent être congelés puis décongelés. Toutefois, des congélations et décongélations répétées peuvent entraîner la perte de réactivité immunologique de l'antigène et des toxines A et B.
3. Certains échantillons peuvent entraîner des réactions faibles. Ce phénomène peut découler d'un certain nombre de facteurs tels que la présence de faibles niveaux d'antigènes ou de toxines, la présence de substances anticorps ou la désactivation des enzymes dans les selles. Les bandes peuvent présenter une couleur claire à foncée. Ces échantillons doivent être rapportés positifs si une ligne bleue ou une ligne partielle est observée. Une ligne bleue partielle évidente est interprétée comme résultat positif.
4. Les échantillons de selles conservés dans 10 % de formol, de formol thimérosal, dans du formol d'acétate de sodium ou de l'alcool polyvinylique ne peuvent pas être utilisés.
5. Le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® est un test qualitatif. L'intensité de la couleur ne doit pas être interprétée en termes quantitatifs.
6. Certains isolats du *C. sordellii* peuvent réagir lors du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® suite à la production de toxines immunologiquement associées (1).
7. Des taux d'infestation pouvant atteindre 50 % ont été signalés chez des enfants. Un niveau élevé a également été signalé chez des patients atteints de mucoviscidose (1,3). Les résultats peuvent se révéler positifs dans ces groupes mais ils doivent être considérés en association avec une infestation potentielle.
8. Le seul organisme autre que *C. difficile* ayant réagi à la bande de toxines du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® correspond au *Clostridium sordellii* VPI 9048. Cette souche produit des toxines HT et LT homologues aux toxines A et B, respectivement.
9. Aucune donnée n'est disponible sur les effets des lavages coliques, des lavements barytés, des laxatifs ou des préparations de selles sur la performance du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®. Toutes ces procédures peuvent provoquer une dilution extensive ou la présence d'adjuvants susceptibles d'affecter la performance du test.

VALEURS ATTENDUES

La maladie *Clostridium difficile* est principalement une maladie nosocomiale détectée chez les personnes âgées et la fréquence de cette maladie dépend de facteurs tels que la population des patients, le type d'institution et l'épidémiologie. Les incidences de la maladie *C. difficile* signalées chez des patients présentant des diarrhées associées aux antibiotiques sont comprises entre 5 et 20 %, les hôpitaux pouvant présenter des taux supérieurs ou inférieurs à ces chiffres. Il est important de considérer les résultats des tests en association

avec les symptômes cliniques car certains adultes sains et un grand nombre d'enfants sains (jusqu'à 50 %) présentent des résultats positifs à la toxine du *C. difficile*. Par ailleurs, on a pu observer des taux compris entre 22 et 32 % de *C. difficile* chez des patients atteints de mucoviscidose (1,3). Lors des études réalisées pour ce dispositif, avec des patients symptomatiques, l'incidence des toxines A et B était de 12 % et le test GDH était de 18 %. Un résultat positif dans la partie antigène du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® confirme la présence du *C. difficile* dans un échantillon de selles et un résultat négatif indique l'absence de cet organisme. Un résultat positif dans la partie toxine du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® confirme la présence de toxines de *C. difficile* dans un échantillon de selles et un résultat négatif indique l'absence de toxines ou des niveaux de toxines insuffisants pour être détectés.

EFFICACITÉ DU TEST

Évaluation clinique de la partie antigène du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

La partie antigène du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® a été comparée à une culture bactérienne. Les échantillons testés lors de cette évaluation ont été soumis aux laboratoires cliniques pour des tests de routine. Le test de culture bactérienne a été réalisé selon les procédures internes de l'établissement. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Résumé des performances cliniques comparant le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® à la culture bactérienne

n = 1126	Culture bactérienne Positif	Culture bactérienne Négatif
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Bande antigène positive	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Bande antigène négative	21	842

		Indice de confiance de 95 %
Sensibilité	90,5%	85,7 – 93,9
Spécificité	93,1%	91,2 – 94,7
Valeur prédictive positive	76,4%	70,7 – 81,3
Valeur prédictive négative	97,6%	96,2 – 98,4
Corrélation	92,6%	91,8 – 93,4

Les échantillons contradictoires ont été évalués en utilisant les tests ELISA actuels pour le glutamate déshydrogénase *C. difficile*.
Vingt-neuf des 62 échantillons faussement positifs se sont révélés positifs à un autre test GDH, et ont été considérés comme effectivement positifs.
Treize des 21 échantillons faussement négatifs se sont révélés négatifs à un autre test GDH, et ont été considérés comme effectivement négatifs.

La partie antigène du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® a été comparée à des cultures de tissus pour la détection de la toxine C. difficile. Les échantillons testés lors de cette évaluation ont été soumis aux laboratoires cliniques pour des tests de routine. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 2. La partie antigène du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® a détecté 98,7 % des échantillons positifs avec les cultures de tissus.

Tableau 2. Résumé des performances cliniques comparant le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® à la culture tissulaire

n = 1126	Culture tissulaire Positif	Culture tissulaire Négatif
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Bande antigène positive	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Bande antigène négative	2	861

Évaluation clinique de la partie toxines du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

La partie toxines du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® a été comparée aux cultures de tissus dans deux laboratoires cliniques et dans les locaux de TECHLAB®, Inc. Les échantillons inclus dans l'évaluation ont été soumis aux tests de routine des laboratoires cliniques. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Résumé des performances cliniques comparant le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® à la culture tissulaire

n = 1126	Culture tissulaire Positif	Culture tissulaire Négatif
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Bande toxine positive	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Bande toxine négative	19	964

		Indice de confiance de 95 %
Sensibilité	87,8%	81,4 - 92,3
Spécificité	99,4%	98,6 - 99,7
Valeur prédictive positive	95,8%	90,7 - 98,3
Valeur prédictive négative	98,1%	96,9 - 98,8
Corrélation	97,8%	97,6 - 98,0

Les échantillons contradictoires ont été évalués avec les tests ELISA actuels pour les toxines A et B.
Cinq échantillons faussement positifs sur les 6 étaient positifs d'après le test ELISA et ont été considérés comme effectivement positifs.
Douze échantillons faussement négatifs sur les 19 étaient négatifs d'après le test ELISA et ont été considérés comme effectivement négatifs.

EFFET DE LA CONSISTANCE DE L'ÉCHANTILLON DE SELLES

Effet de la consistance de l'échantillon de selles sur le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

La réaction des échantillons de selles de consistances différentes dans la partie antigène (n=978) et dans la partie toxines (n=981) du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* est présentée dans les Tableaux 4 et 5. Les pourcentages de réactions positives avec la culture bactérienne ou le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* étaient similaires pour les trois types d'échantillons de selles (liquide, semi-solide et solide). Tous les échantillons ont été soumis au test C. difficile. À l'origine de cette soumission, on trouve les antécédents médicaux du patient et non la consistance des échantillons. Dans la partie antigène, les résultats montrent que le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* se comporte de manière similaire à la culture bactérienne lors du test des échantillons de différentes consistances. Dans la partie toxine, les résultats montrent que le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* se comporte de manière similaire aux cultures de tissus lors du test des échantillons de différentes consistances.

Tableau 4. Réaction dans la partie antigène du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* pour des échantillons de selles de consistances différentes

Nombre d'échantillons (n = 978)	Échantillons liquides (n = 335)	Échantillons semi-solides (n = 522)	Échantillons solides (n = 121)
Positif sur la culture bactérienne	59 (17,6%)	110 (21,1%)	19 (15,7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Bande antigène positive	72 (21,5%)	128 (24,5%)	25 (20,7%)
Négatif sur culture bactérienne	276 (82,4%)	412 (78,9%)	102 (84,3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Bande antigène négative	263 (78,5%)	394 (75,5%)	96 (79,3%)

Tableau 5. Réaction dans la partie toxines du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* pour des échantillons de selles de consistances différentes

Nombre d'échantillons (n = 981)	Échantillons liquides (n = 336)	Échantillons semi-solides (n = 523)	Échantillons solides (n = 122)
Positif sur culture de tissus	43 (12,8%)	81 (15,5%)	8 (6,6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Bande toxine positive	42 (12,5%)	72 (13,8%)	7 (5,7%)
Négatif sur culture de tissus	293 (87,2%)	442 (84,5%)	114 (93,4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Bande toxine négative	294 (87,5%)	451 (86,2%)	115 (94,3%)

SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

Le seuil de détection de l'essai a été établi à des concentrations de 0,63 ng/ml pour la toxine A, de 0,16 ng/ml pour la toxine B et de 0,8 ng/ml pour le glutamate déshydrogénase.

REPRODUCTIBILITÉ

La reproductibilité du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* a été déterminée à partir de 12 échantillons de selles codés pour éviter leur identification pendant le test. Les tests ont été réalisés par 3 laboratoires indépendants qui ont analysé les échantillons sur 3 jours. Les échantillons ont donné les résultats prévus sur toute la durée des essais.

RÉACTIVITÉ CROISÉE

Les échantillons de selles inoculés par les micro-organismes suivants, pour une concentration finale d'environ 10^8 ou supérieure d'organismes par ml, n'ont pas réagi sur les bandes de test antigène ou toxines du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* :

Bactéries ou agents pathogènes : *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (nontoxigenic)*, Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC*, Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7*, Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans)*, Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

Le seul organisme autre que *C. difficile* ayant réagi à la bande de toxines du test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* correspond au *Clostridium sordellii* VPI 9048. Cette souche produit des toxines HT et LT homologues aux toxines A et B, respectivement.

Les virus suivants, à des TCID de $10^{3.3}$ à $10^{8.25}$ n'ont pas réagi au test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* :

Virus : adénovirus de types 1, 2, 3, 5, 40, 41, coronavirus humains, Coxsackievirus B2, B3, B4, B5, échovirus 9, 11, 18, 22, 33, entérovirus de types 68, 69, 70, 71, rotavirus.

INTERFÉRENCES ANALYTIQUES

Les substances suivantes (formulations américaines) n'ont pas modifié le résultat des tests lorsqu'elles étaient présentes dans les selles aux concentrations indiquées ci-après : mucine (3,5 % p/v), sang humain (40 % v/v), sulfate de baryum (5 % p/v), Imodium® (5 % v/v), Kaopectate® (5 % v/v), Pepto-Bismol® (5 % v/v), acide stérique/palmitique (40 % p/v), Métronidazole (0,25 % p/v), Vancomycine (0,25 % p/v).

RÉACTION DES ISOLATS CLINIQUES OBTENUS SUR CCFA (GÉLOSE AVEC CYCLOSÉRINE, CEFOXITINE, AMPHOTÉRICINE B)

Au total, 103 isolats cliniques de *C. difficile*, obtenus par culture bactérienne anaérobie sur CCFA au bout de 3 jours à 37 °C, ont été testés avec le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Pour l'analyse, des colonies individuelles ont été collectées et suspendues dans le *Diluant* selon les recommandations concernant les échantillons de selles. Les 103 isolats ont donné une réaction d'antigène positive lors du test.

Soixante-dix de ces 103 isolats (68 %) étaient issus d'échantillons de selles positifs pour la toxine de *C. difficile* d'après la culture de tissus. Parmi eux, 56 (80 %) ont donné une réaction positive pour les toxines lors du dépistage après croissance anaérobie sur CCFA pendant 3 jours à 37 °C.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

ÚČEL POUŽITÍ

Test TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* je rychlá membránová enzymová imunoanalýza pro současnou detekci antigenů glutamát dehydrogenázy a toxinů A a B *Clostridium difficile* v jediné reakční jamce. Test detekuje antigen *C. difficile*, glutamát dehydrogenázu, jako vyšetření na přítomnost *C. difficile* a potvrzuje přítomnost toxické *C. difficile* detekcí toxinů A a B ve vzorcích stolice osob s podezřením na onemocnění *C. difficile*. Test je určen k použití jako pomůcka při diagnóze onemocněním *C. difficile*. Stejně jako u ostatních testů *C. difficile* je výsledky třeba zvažovat ve spojení s anamnézou pacienta.

VYSVĚTLENÍ

Po léčbě antibiotiky se u mnoha pacientů rozvinou gastrointestinální problémy v rozsahu od mírného průjmu po vážnou pseudomembránovou kolitidu. Mnoho případů mírnějších forem gastrointestinálního onemocnění a většina případů pseudomembránové kolitidy je způsobena toxigenními kmeny *Clostridium difficile* (1). Tento organismus je oportunistická anaerobní bakterie, která roste ve střevech, když je normální flora pozměněna účinky antibiotik. Toxigenní kmeny *C. difficile* přenášejí geny kódující toxiny, zatímco netoxigenní kmeny nikoli. Nástup nemoci je spojen s toxiny, které jsou produkovány toxigenními organizmy. Klinické příznaky spojené s touto nemocí jsou přičítány především toxinu A, který patří do skupiny enterotoxinů poškozujících tkáň (2,3). *C. difficile* rovněž produkuje druhý toxin, označovaný jako toxin B. Toxin B, který byl označován jako cytotoxin je toxin detekovaný analýzou tkáňové kultury používanou v mnoha laboratořích. Toxigenní kmeny *C. difficile* produkují oba toxiny nebo pouze toxin B (4-7). Glutamátdehydrogenáza *C. difficile* je dobrým antigenovým markerem organizmu ve stolici, protože je produkována ve vysokých množstvích všemi kmeny, toxigenními i netoxigenními (8-10). Antigen je možné detekovat ve vzorcích stolice testem *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Pozitivní výsledek testu na glutamát dehydrogenázu *C. difficile* potvrzuje přítomnost tohoto organismu ve vzorku stolice; negativní výsledek indikuje jeho nepřítomnost. Pozitivní výsledek testu na toxiny A a B potvrzuje přítomnost toxigenního kmene *C. difficile*.

PRINCIP TESTU

Test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* využívá protilátky specifické pro glutamát dehydrogenázu a toxiny A a B bakterie*C. difficile*. Prostředek obsahuje reakční štěrbinu se třemi svislými linkami imobilizovaných protilátek. Testovací linka antigenu („Ag“) obsahuje protilátky proti glutamát dehydrogenáze *C. difficile*. Kontrolní linka („C“) je tečkována čára, která obsahuje protilátky proti peroxidáze z křenu (HRP). Testovací linka A a B („Tox“) obsahuje protilátky proti toxinům A a B bakterie *C. difficile*. *Konjugát* tvoří protilátky ke glutamát dehydrogenáze a protilátky k toxinům A a B spojené s peroxidázou z křenu. K provedení testu se vzorek přidá do zkumavky obsahující směs *ředicího roztoku* a *konjugátu*. Směs zředěného vzorku a konjugátu se přidá do *vzorkovací jamky* a prostředek se nechá inkubovat 15 minut při pokojové teplotě. Během inkubace se přítomný glutamát dehydrogenáza a toxiny A a B ve vzorku vážou na konjugát protilátky a peroxidázou. Komplexy antigen-protilátka-konjugát migrují filtrační podložkou k membráně, kde jsou zachyceny imobilizovanými protilátkami proti glutamát dehydrogenáze a toxinům A a B v linkách. *Reakční štěrbina* je následně propláchnuta *promývacím tlumivým roztokem* a poté se přidá *substrát*. Po 10minutovém inkubačním období se vizuálně zkontroluje „Ag“ reakce, zda se objeví svislá modrá linka na straně „Ag“ *reakční štěrbiny*. Modrá linka indikuje pozitivní test. Pokud je „Ag“ pozitivní, vizuálně se zkontroluje „Tox“ reakce, zda se objeví modrá linka na straně „Tox“ *reakční štěrbiny*. Modrá linka indikuje pozitivní test. Pozitivní reakce „C“, indikovaná svislou tečkovanou čárou pod částí „C“ *reakční štěrbiny*, potvrzuje, že test fungoval správně a výsledky jsou validní.

CS

DODÁVANÝ MATERIÁL

MEM | DEV — ***Membránové prostředky*** – každé balení obsahuje 1 prostředek

DIL | SPE — ***Ředicí roztok* (22 ml na lahvičku)** – tlumený roztok bílkovin s kapátkem se stupnicí (obsahuje 0,05% ProClin® 300)*

WASH | REAG — ***Promývací tlumivý roztok* (12 ml na lahvičku)** – tlumicí roztok s kapátkem se stupnicí (obsahuje 0,05% ProClin® 300)*

SUBS | REAG — ***Substrát* (3,5 ml na lahvičku)**– roztok obsahuje tetramethylbenzidin

CONJ | ENZ — ***Konjugát* (2,5 ml na lahvičku)** – myší monoklonální protilátka specifická na glutamát dehydrogenázu spojená s peroxidázou z křenu a kozími polyklonálními protilátkami specifickými na toxiny A a B spojenými s peroxidázou z křenu v tlumeném roztoku bílkovin (obsahuje 0,05% ProClin® 300)*

CONTROL | + — ***Pozitivní kontrola* (2 ml)** – antigen v tlumeném roztoku bílkovin

Jednorázové plastové přenosové pipety – s rysem 25 µl, 400 µl a 500 µl

IVD — Pro diagnostické použití *in vitro*

*Signální slovo: Varování
H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci.
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

POŽADOVANÝ MATERIÁL A VYBAVENÍ, KTERÉ NENÍ DODÁVANÉ

Malé vyšetřovací zkumavky (např. plastové Eppendorfovy zkumavky nebo skleněné zkumavky)
Proužky aplikátoru *Časovač* *Vortex*
Jednorázové rukavice pro manipulaci se vzorky stolice *Pipetovací automat a špičky*

SKLADOVATELNOST A SKLADOVÁNÍ

Datum exspirace soupravy je uvedeno na štítku. Datum exspirace každé součásti je uvedeno na jednotlivých štítcích. Soupravu skladujte v rozmezí 2 až 8 °C.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Reagencie z různých souprav se nesmějí směšovat nebo zaměňovat. Nepoužívejte soupravu po datu expirace.
2. Každý součást soupravy by měla být zkontrolována, zda je těsná. Po přijetí zkontrolujte soupravu, abyste ověřili, že jednotlivé součásti nejsou zmrzlé nebo teple na dotek v důsledku nevhodných přepravních podmínek.
3. PŘED POUŽITÍM NECHTE všechny složky ohřát NA POKOJOVOU TEPLOTU.
4. Víčka, špičky a kapátko jsou barevně označeny; nesměšujte je ani nezaměňujte!
5. Nepoužívejte zmražené reagencie. Soupravu skladujte v rozmezí 2 až 8 °C.

6. Balení obsahující *membránový prostředek* by mělo mít před otevřením pokojovou teplotu. Před použitím udržujte membránový prostředek suchý.
7. Vzorky stolice použijte během 72 hodin od odběru, abyste získali optimální výsledky. Vzorky, které jsou zmrazené mohou ztratit aktivitu v důsledku zmrazení a rozmrazení. Zmrazené vzorky rozmrazujte při pokojové teplotě.
8. Podržte lahvičky reagencií svisle pro dávkování reagencií a zajištění konzistentní velikosti kapky a správného objemu.
9. Se vzorky a membránovým prostředkem je třeba nakládat a likvidovat jako možné biologické nebezpečí.
10. Membránový prostředek nelze používat opakovaně.
11. Test byl optimalizován na citlivost: a specificitu. Změny ve specifikovaném postupu nebo podmínkách testu mohou ovlivnit citlivost a specificitu testu. Neodchylujte se od specifikovaného postupu.
12. Buďte pozorní k celkové době analýzy při testování více než jednoho vzorku stolice. Nejprve přidejte *ředicí roztok* a potom přidejte *konjugát* do každé zkumavky s *ředicím roztokem*. Potom přidejte vzorek do zkumavky s *ředicím roztokem/konjugátem*. Důkladně promíchejte zředěné vzorky a přeneste je do *membránových prostředků*. Krok 15minutové inkubace začíná po přenesení poslední směsi zředěného vzorku a konjugátu do posledního *membránového prostředku*.
13. Pokud se *substrát* změní na tmavě modrou /fialovou barvu, zavolejte technické služby a požádejte o výměnu.
14. Vzorky stolice mohou obsahovat možné infekční složky a je s nimi třeba zacházet v souladu s úrovní Biosafety Level 2, která se doporučuje pro jakékoliv potenciálně infekční vzorky lidského séra nebo krve v manuálu CDC/NIH (Centra pro kontrolu nemocí/Národního zdravotnického institutu) „Biologická bezpečnost v mikrobiologických a biomedicínských laboratořích".
15. Všechny reagencie jsou určeny pouze pro diagnostické účely *in vitro*.
16. Při provádění testu noste jednorázové rukavice.
17. Reagencie obsahuje 0,05% ProClin® 300 jako konzervant. Ačkoli je koncentrace nízká, je prokázáno, že ProClin® 300 je škodlivý. Pokud se objeví podráždění kůže nebo vyrážka, vyhledejte lékaře. Vysvlečte kontaminované oblečení a před opětovným použitím je vyperte. S reagenciemi manipulujte podle stávajících nařízení pro bezpečnost v laboratoři a správných laboratorních postupů. Bezpečnostní datové listy pro tento produkt jsou dostupné na vyžádání, kontaktujte technickou podporu.
18. Řiďte se vašimi národními, regionálními a místními předpisy pro likvidaci odpadu.

ODBĚR VZORKŮ STOLICE, MANIPULACE SE VZORKY A JEJICH SKLADOVÁNÍ

Přijatelné typy vzorků
Čerstvé vzorky stolice
Zmrazené vzorky stolice
Vzorky v transportních médiích (Cary Blair, C&S)

Nepoužívat
Vzorky stolice ve formalinovém fixačním přípravku (např. formalin acetát sodný, 10% formalin, merthiolát formalin)
Vzorky stolice v alkoholovém fixačním přípravku (např. polyvinylalkohol)

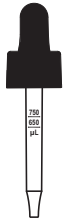
Skladování vzorků Teplota	Přijatelná doba skladování	Poznámky
2–8 °C	72 hodin	Ideální vzorky jsou mně než 24 hodin staré
Zmrazený ≤ -10 °C	Déle než 72 hodin	Rozmrazujte při pokojové teplotě. Opakované zmrazení a rozmrazení vzorků může vést ke ztrátě aktivity vzorku v důsledku degradace toxinů.

1. Standardní odběr a manipulace používané interně pro vzorky stolice jsou vhodné.
2. Vzorky stolice je třeba odebírat v čistých, nepropustných nádobách.
3. Skladování vzorků stolice v *ředicím roztoku* se nedoporučuje.
4. Nenechávejte vzorky stolice ve směsi ředicí *roztok/konjugát* > 24 hodin.

PŘÍPRAVA VZORKU

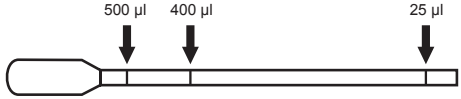
1. Před použitím nechte všechny reagencie a požadovaný počet prostředků ohřát na pokojovou teplotu. Doporučuje se odstranit reagencie z pěnové vložky, aby se snížila doba potřebná k zahřátí na pokojovou teplotu.
2. Připravte a označte jednu malou testovací zkumavku pro každý vzorek a volitelné externí kontroly podle potřeby.
3. Pomocí černého kapátka se stupnicí přidejte 750 µl (2. ryska od špičky) ředicího *roztoku* do každé zkumavky na vzorky stolice. **Pro vzorky v transportním médiu, například Cary Blair nebo C&S, přidejte do zkumavky 650 µl (1. ryska od špičky) *ředicího roztoku*.**

Typ vzorku	Objem ředicího *roztoku*
Čerstvé vzorky stolice	750 µl (2. značka od špičky)
Zmrazené vzorky stolice (zmražené neředěné)	750 µl (2. značka od špičky)
Vzorky v transportních médiích (Cary Blair, C&S)	650 µl (1. ryska od špičky)
Externí kontroly (pozitivní a negativní)	750 µl (2. značka od špičky)



4. Přidejte jednu kapku *konjugátu* (lahvička s červeným víčkem) do každé zkumavky.
5. Použijte jednu jednorázovou pipetu (obsažené v sadě) na každý vzorek – pipety mají rysky 25 µl, 400 µl a 500 µl.

Transferová pipeta se stupnicí:

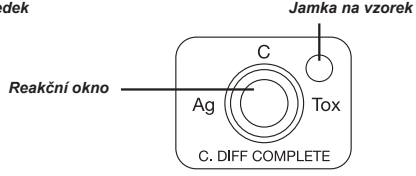


6. **Důkladně promíchejte všechny vzorky bez ohledu na konzistenci - je nezbytné, aby byly vzorky před přenosem rovnoměrně suspendovány.**
   Tekuté/polotuhé vzorky – pipetujte 25 µl vzorku přenosovou pipetou a nadávkujte do směsi *ředicí roztok/konjugát*. Stejnou přenosovou pipetou zamíchejte zředěný vzorek.
   Formované/tuhé vzorky – je třeba dávat pozor, aby bylo do směsi vzorku přidáno správné množství fekálií. Zamíchejte důkladně vzorek dřevěnou tyčkou aplikátoru a přeneste malou část (přibližně 2 mm v průměru, ekvivalent 25 µl) vzorku do směsi ředicí roztok/konjugát. Vzorek převeďte na emulzi aplikační tyčinkou.
   Vzorky stolice v transportních médiích Cary Blair nebo C&S - pipetujte 100 µl (2 kapky z přenosové pipety) vzorku do směsi *ředicí roztok/konjugát*.
7. **Volitelné externí kontrolní vzorky:**
   Externí pozitivní kontrola - přidejte jednu kapku *pozitivní kontroly* (lahvička s šedým víčkem) do směsi *ředicí roztok/konjugát*.
   Externí negativní kontrola - přidejte 25 µl *ředicího vzorku* do směsi *ředicí roztok/konjugát*.

POZNÁMKA: Přenesení příliš malého množství vzorku nebo nedostatečné smíšení či suspendování vzorku ve směsi ředicí roztok/konjugát může vést k falešně negativním výsledkům testu. Přidání přílišného množství vzorku stolice může způsobit neplatné výsledky z důvodu omezeného toku vzorku.

ZKUŠEBNÍ POSTUP

1. Použijte jeden *membránový prostředek* na vzorek a jeden prostředek na volitelnou externí pozitivní nebo negativní kontrolu podle potřeby. Foliové balení obsahující prostředky by mělo mít před otevřením pokojovou teplotu. Použijte zařízení ihned po otevření. Vhodně označte každý prostředek a orientujte jej na rovném povrchu tak, aby text „C. DIFF COMPLETE“ byl na spodní straně zařízení a malá vzorkovací jamka byla v horním pravím rohu prostředku.



2. Zavřete každou zkumavku zředěného vzorku a důkladně zamíchejte. Správné promíchání lze dosáhnout na vortexu nebo převrácením zkumavky. Jakmile dojde ke zředění *pozitivní kontroly* ve směsi *ředicí roztok/konjugát*, může se inkubovat při pokojové teplotě jakoukoli dobu až 24 hodin před jeho nanesením do *membránového prostředku*.
3. Novou přenosovou pipetou přeneste 500 µl směsi zředěného vzorku a konjugátu do ***vzorkovací jamky*** (malý otvor v horním pravém rohu) *membránového zařízení* a ujistěte se, že došlo k vytlačení tekutého vzorku na kapilární podložku uvnitř *membránového zařízení*. Při vložení vzorku do vzorkovací jamky se ujistěte, že špička přenosové pipety je skloněna v úhlu směrem k *reakční štěrbině* (větší otvor uprostřed prostředku).
4. Inkubujte prostředek při pokojové teplotě 15 minut – vzorek prosákne prostředkem a vlhká oblast se rozšíří napříč *reakční štěrbiny*.

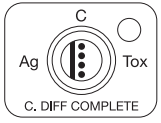
POZNÁMKA KE VZORKŮM, U NICHŽ NEDOJDE K MIGRACI:
Příležitostně nemusí dojít ke správné migraci zředěného vzorku a reakční štěrbina není plně vlhká. Pokud nedojde během 5 minut k úplnému navlhčení reakční štěrbiny od přidání vzorku do vzorkovací jamky, přidejte 100 µl (4 kapky) ředicího roztoku do vzorkovací jamky a počkejte dalších 5 minut (celkem 20 minut).

5. Po inkubaci přidejte 300 µl *promývacího tlumivého roztoku* do ***reakční štěrbiny*** pomocí bílého kapátka se stupnicí. Nechte *promývací tlumivý roztok* protéci membránou reakční štěrbiny a počkejte na úplnou absorpci.
6. Přidejte 2 kapky *substrátu* (lahvička s bílým víčkem) do ***reakční štěrbiny***. Odečtěte a zaznamenejte výsledky vizuálně po 10 minutách

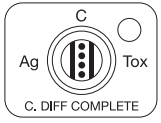
INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

1. Interpretace testu je nejspolehlivější, když je prostředek odečten ihned na konci 10minutové reakční doby. Odečítejte prostředek z normální pracovní vzdálenosti na dobře osvětleném místě. Pozorujte přímo kolmo nad prostředkem.
2. Pozorujte prostředek, zda se objeví modré tečky uprostřed *reakční štěrbiny*, což představuje interní pozitivní kontrolu. Výskyt jakékoli kontrolní tečky (teček) představuje validní interní kontrolu. Pozadí se může jevit bílé až světle modré. Pozorujte prostředek, zda se objeví modré linky na stranách „Ag“ a „Tox“ *reakční štěrbiny*, což představuje linky testu. Linky mohou být slabé až tmavé intenzity.
3. **Pozitivní antigenový („Ag“) výsledek:** Pozitivní výsledek antigenu může být interpretován kdykoli mezi přidáním *substrátu* a uplynutím 10 minut na odečet. Pro pozitivní výsledek antigenu jsou viditelné modrá „Ag“ linka a tečkovaná modrá kontrolní linka pod „C“ (obrázek 1a). Linky mohou být slabé až tmavé intenzity. Zjevně částečná linka je interpretována jako pozitivní výsledek. Odbarvení membrány nelze interpretovat jako pozitivní výsledek. Pozitivní výsledek výsledek indikuje přítomnost *C. difficile*.
4. **Positivní antigenový a toxinový („Tox“) výsledek** Pokud je výsledek antigenu pozitivní (tj. jsou vidět modrá linka „Ag“ a modrá tečkovaná linka pod „C“), pokračujte v interpretaci výsledku toxinu. Pozitivní výsledek toxinu může být interpretován kdykoli mezi přidáním *substrátu* a uplynutím 10 minut na odečet. V případě pozitivního výsledku toxinu je vidět modrá linka „Tox“ (obrázek 1b). Linka může být slabé až tmavé intenzity. Zjevně částečná linka je interpretována jako pozitivní výsledek. Odbarvení membrány nelze interpretovat jako pozitivní výsledek. Pozitivní výsledek výsledek indikuje přítomnost toxinu *C. difficile*.
5. **Negativní výsledek:** Test nemůže být interpretován jako negativní nebo neplatný, dokud neuplyne 10 minut po přidání *substrátu*. Jedna modrá tečkovaná linka je viditelná uprostřed *reakční štěrbiny* pod „C“ a žádné linky testu nejsou na straně „Ag“ ani „Tox“ *reakční štěrbiny* (obrázek 1c). Negativní výsledek v části antigenu indikuje, že antigen *C. difficile* není ve vzorku přítomný nebo je pod mezí detekce testu. Negativní výsledek v části toxinu indikuje, že toxin *C. difficile* není ve vzorku přítomný nebo je pod mezí detekce testu.
6. **Neplatný výsledek:** V reakční štěrbině nejsou vidět žádné linky (obrázek 1d). Výsledek testu je neplatný, pokud pod „C“ není přítomná modrá tečkovaná linka po uplynutí reakční doby (obrázky 1e, 1f, 1g).
7. **Negativní na antigen („Ag“), pozitivní na toxin („Tox“):** Nízké procento vzorků může být testováno negativní na antigen, ale pozitivní na toxin. Tyto vzorky je třeba považovat za neurčité a opakovaně otestovat s novým vzorkem (obrázek 1h). Pokud při opakovaném testu je vzorek negativní na antigen, ale pozitivní na toxin, vykažte pozitivní výsledek toxinu.

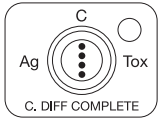
OBRÁZEK 1: INTERPRETACE VÝSLEDKŮ *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*



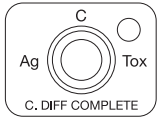
Obrázek 1a
Pozitivní antigenový výsledek



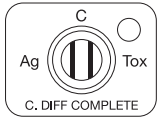
Obrázek 1b
Positivní antigenový a toxinový výsledek



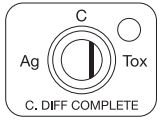
Obrázek 1c
Negativní výsledek



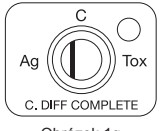
Obrázek 1d
Neplatný výsledek



Obrázek 1e
Neplatný výsledek



Obrázek 1f
Neplatný výsledek



Obrázek 1g
Neplatný výsledek



Obrázek 1h
Viz 7 pro interpretaci

KONTROLA KVALITY

Interní: Ve střední části *reakční štěrbiny* musí být viditelná tečkovaná modrá linka pod „C“ na každém *membránovém prostředku* použitím k testu. Objevení modrých kontrolních teček potvrzuje, že byly vzorek a reagencie přidány správně, že jsou reagencie aktivní v době provedení testu a že vzorek správně migroval přes *membránový prostředek*. Rovněž potvrzuje reaktivitu dalších reagencií spojených s analýzou. Jasné pozadí v oblasti výsledku je považováno za interní negativní kontrolu. Pokud je test proveden správně a reagencie fungují správně, pozadí bude bílé, což umožní získat jednoznačný výsledek.

Externí: Reaktivitu sady *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* je třeba ověřit po přijetí pomocí *pozitivní kontroly* a negativní kontroly (*ředicí roztok*). *Pozitivní kontrola* se dodává se soupravou (lahvička s šedým víčkem). *Pozitivní kontrola* potvrzuje reaktivitu dalších reagencií spojených s analýzou a není určena pro zajištění přesnosti analytické meze stanovení. *Ředicí roztok* se používá jako negativní kontrola. Další testy se mohou provádět s kontrolami ke splnění požadavků místních nebo národních předpisů a požadavků akreditačních organizací.

OMEZENÍ

1. Test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* se používá pro detekci antigenu a toxinů *C. difficile* ve vzorcích stolice. Test potvrzuje přítomnost toxinu ve stolici a tato informace by měla být zvážena lékařem ve světle klinické anamnézy a fyzického vyšetření pacienta. Test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* zjišťuje úrovně toxinu A při ≥ 0,63 ng/ml, toxin B při ≥ 0,16 ng/ml a glutamát dehydrogenázu při ≥ 0,8 ng/ml.
2. Vzorky stolice jsou extrémně složité. Optimální výsledky testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* se získají se vzorky, které jsou méně než 24 hodin staré. Většinu neředěných vzorků je možné skladovat mezi 2 °C a 8 °C po dobu 72 hodin bez významné degradace toxinů. Pokud nejsou vzorky analyzovány během tohoto období, mohou být zmrazeny a rozmrazeny. Opakované zmrazování a rozmrazování však může vést ke ztrátě imunoreaktivity antigenu a toxinů A a B.
3. Některé vzorky mohou poskytnout slabou reakci. Příčinou může být řada různých faktorů, například přítomnost nízkých koncentrací antigenu nebo toxinu, přítomnost vázajících látek nebo inaktivující enzymy ve stolici. Linky mohou být slabé až tmavé intenzity. Tyto vzorky by měly být vykázány jako pozitivní, pokud je pozorovány jakákoli modrá linka, dokonce i jen částečná. Zjevně částečná modrá linka je interpretována jako pozitivní výsledek.
4. Vzorky stolice konzervované v 10% formalinu, merthiolát formalinu, formalin acetát sodném nebo polyvinylalkoholu nelze používat.
5. Test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* je kvalitativní. Intenzitu barvy nelze posuzovat kvantitativně.
6. Některé izoláty *C. sordellii* mohou reagovat v testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* z důvodu produkce imunologicky příbuzných toxinů (1).
7. U malých dětí byly hlášeny rychlosti kolonizace až do 50 %. Vysoká rychlost byla také hlášena u pacientů s cystickou fibrózou (1,3). U těchto skupin se mohou vyskytnout pozitivní výsledky, ale musí se na ně nahlížet ve spojení s možností být kolonizovaný přenašeč.
8. Jediný organismus jiný než *C. difficile*, který reagoval v toxinové části testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* byl *Clostridium sordellii* VPI 9048. Tento kmen produkuje toxiny HT a LT, které jsou homology toxinů A a B.
9. Nejsou k dispozici žádná data o účincích střevních proplachů, bariových klystýrů, projímadel nebo střevních přípravků na funkci testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Všechny tyto postupy mohou vést ke značnému zředění nebo přítomnosti přídavných látek, která mohou ovlivnit výkon testu.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Onemocnění způsobené *Clostridium difficile* je hlavně nozokomiální onemocnění starších pacientů a četnost onemocnění závisí na faktorech jako je populace pacientů, typ instituce a epidemiologie. Hlášený výskyt onemocnění způsobených *C. difficile* u pacientů s průjmem spojeným s léčbou antibiotiky může být v rozmezí 5 až 20 % a nemocnice mohou mít zkušenosti s nižším nebo vyšším rozsahem. Je důležité zvážit výsledky testu ve spojení s klinickými symptomy, protože zdraví dospělí a velký počet zdravých malých dětí (až 50 %) bude pozitivní na toxin *C. difficile*. Kromě toho byla také u pacientů s cystickou fibrózou hlášena míra přenosu *C. difficile* 22 % až 32 % (1,3). Ve studiích prováděných na tomto zařízení pomocí symptomatických pacientů byla incidence toxinů A a B12 % a GDH 18 %. Pozitivní výsledek antigenové části testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* potvrzuje přítomnost *C. difficile* ve vzorku stolice; negativní výsledek indikuje nepřítomnost organismu. Pozitivní výsledek toxinové části testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* potvrzuje přítomnost toxinu *C. difficile* ve vzorku stolice; negativní výsledek indikuje nepřítomnost toxinu nebo nedostatečné množství toxinu pro detekci.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Klinické hodnocení antigenové části testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Antigenová část testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® byla srovnána s bakteriální kultivací. Vzorky zahrnuté v hodnocení byly odeslány do klinické laboratoře k běžnému testování. Test bakteriální kultury byl prováděn podle interních postupů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Souhrn klinického výkonu srovnávající test C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® s bakteriální kultivací

n = 1126	Bakteriální kultura Pozitivní	Bakteriální kultura Negativní
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linka antigenu, pozitivní	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linka antigenu, negativní	21	842

		95% interval spolehlivosti
Citlivost	90,5 %	85,7–93,9
Specificita	93,1 %	91,2–94,7
Pozitivní predikční hodnota	76,4 %	70,7–81,3
Negativní predikční hodnota	97,6 %	96,2–98,4
Korelace	92,6 %	91,8–93,4

Diskrepantní vzorky byly hodnoceny stávajícími testy ELISA na glutamátdehydrogenázu *C. difficile*.
Dvacet devět z 62 falešně pozitivních vzorků bylo pozitivních v dalším GDH testu a byly posouzeny jako skutečně pozitivní.
Třináct z 21 falešně negativních vzorků bylo negativních v dalším GDH testu a byly posouzeny jako skutečně negativní.

Antigenová část testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® byla srovnána analýzou tkáňové kultury k detekci toxinu C. difficile. Vzorky zahrnuté v hodnocení byly odeslány do klinické laboratoře k běžnému testování. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2. Antigenová část testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® detekovala 98,7 % vzorků pozitivně určených tkáňovou kulturou.

Tabulka 2. Souhrn klinického výkonu srovnávající test C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® s analýzou tkáňové kultury.

n = 1126	Tkáňová kultura Pozitivní	Tkáňová kultura Negativní
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linka antigenu, pozitivní	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linka antigenu, negativní	2	861

Klinické hodnocení toxinové části testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Toxinová část textu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® byla srovnána a analýzou tkáňové kultury ve dvou klinických laboratořích a interně ve společnosti TECHLAB®, Inc. Vzorky zahrnuté v hodnocení byly odeslány do klinické laboratoře k běžnému testování. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Souhrn klinického výkonu srovnávající test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® s analýzou tkáňové kultury.

n = 1126	Tkáňová kultura Pozitivní	Tkáňová kultura Negativní
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Pozitivní linka toxinu	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Negativní linka toxinu	19	964

		95% interval spolehlivosti
Citlivost	87,8 %	81,4–92,3
Specificita	99,4 %	98,6–99,7
Pozitivní predikční hodnota	95,8 %	90,7–98,3
Negativní predikční hodnota	98,1 %	96,9–98,8
Korelace	97,8 %	97,6–98,0

Diskrepantní vzorky byly hodnoceny stávajícími testy ELISA na toxiny A a B.
Pět ze 6 falešně pozitivních vzorků bylo pozitivních v ELISA testu a byly posouzeny jako skutečně pozitivní.
Dvanáct z 19 falešně negativních vzorků bylo negativních ELISA testem a byly posouzeny jako skutečně negativní.

VLIV KONZISTENCE VZORKU STOLICE

Účinky konzistence vzorků stolice na test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Reakce vzorků stolice různých konzistencí v části antigenu (n = 978) a části toxinů (n = 981) v testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® je znázorněna v tabulce 4 a 5. Procenta pozitivních reakcí za využití buď analýzy kultury, nebo testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® byla podobná ve všech třech vzorcích stolice (kapalné, polotuhé a tuhé). Všechny vzorky byly odeslány na test na *C. difficile*. Základem odeslání byla klinická anamnéza pacienta a nikoli konzistence vzorku. V antigenové části výsledky ukázaly, že test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® má podobné výsledky s bakteriální kulturou, pokud mají testované vzorky různou konzistenci. V toxinové části výsledky ukázaly, že test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® má podobné výsledky s analýzou tkáňové kultury, pokud mají testované vzorky různou konzistenci.

Tabulka 4. Reakce vzorků stolice různé konzistence v antigenové části testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Počet vzorků (n = 978)	Kapalné vzorky (n = 335)	Polotuhý Vzorky (n = 522)	Pevné vzorky (n = 121)
Pozitivní bakteriální kultivací	59 (17,6 %)	110 (21,1 %)	19 (15,7 %)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linka antigenu, pozitivní	72 (21,5 %)	128 (24,5 %)	25 (20,7 %)
Negativní bakteriální kultivací	276 (82,4 %)	412 (78,9 %)	102 (84,3 %)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linka antigenu, negativní	263 (78,5 %)	394 (75,5 %)	96 (79,3 %)

Tabulka 5. Reakce vzorků stolice různé konzistence v toxinové části testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Počet vzorků (n = 981)	Kapalné vzorky (n = 336)	Polotuhý Vzorky (n = 523)	Pevné vzorky (n = 122)
Pozitivní tkáňovou kultivací	43 (12,8 %)	81 (15,5 %)	8 (6,6 %)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Pozitivní linka toxinu	42 (12,5 %)	72 (13,8 %)	7 (5,7 %)
Negativní tkáňovou kultivací	293 (87,2 %)	442 (84,5 %)	114 (93,4 %)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Negativní linka toxinu	294 (87,5 %)	451 (86,2 %)	115 (94,3 %)

ANALYTICKÁ CITLIVOST

Mezní hodnota testu byla stanovena při koncentracích 0,63 ng/ml pro toxin A, 0,16 ng/ml pro toxin B a 0,8 ng/ml pro glutamátdehydrogenázu.

REPRODUKOVATELNOST

Reprodukovatelnost testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® byla určena pomocí 12 vzorků stolice, které byly zakódovány, aby se zabránila jejich identifikace během testování. Analýzy byly prováděny 3 nezávislými laboratořemi, každý vzorek byl kultivován 3 dny. Vzorky dosáhly případů očekávaných výsledků ve 100 %.

KŘÍŽOVÁ REAKTIVITA

Vzorky stolice inokulované následujícími mikroorganismy na konečnou koncentraci přibližně 10^8 nebo více organismů na ml nereagovaly v antigenové ani toxinové části testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Bakterie nebo patogen: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (netoxikogenní), *Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans), *Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

Jediný organismus jiný než *C. difficile*, který reagoval v toxinové části testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® byl *Clostridium sordellii* VPI 9048. Tento kmen produkuje toxiny HT a LT, které jsou homology toxinů A a B.

Následující viry o velikosti $10^{3,3}$ až $10^{8,25}$ jednotek TCID na 0,2 ml, nereagovaly v testu *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®:

Viry: Adenovirus typy 1, 2, 3, 5, 40, 41, lidský koronavirus, coxsackievirus B2, B3, B4, B5, echovirus 9, 11, 18, 22, 33, enterovirus typ 68, 69, 70, 71, rotavirus.

INTERFERUJÍCÍ LÁTKY

Následující látky (složení USA) neměly žádný vliv na výsledky testu, pokud byly ve stolici obsaženy v uvedených koncentracích: mucin (3,5 % hm.), lidská krev (40 % obj.), síran barnatý (5 % hm.), Imodium® (5 % obj.), Kaopectate ® (5 % obj.), Pepto-Bismol ® (5 % obj.), stearová/palmitová kyselina (40 % hm.), metronidazol (0,25 % hm.), vankomycin (0,25 %.hm.).

REAKCE NA KLINICKÉ IZOLÁTY ZÍSKANÉ NA CYKLOSERIN-CEFOITIN-FRUKTOZOVÉM AGARU (CCFA)

Celkem 103 klinických izolátů *C. difficile*, získaných z anaerobní bakteriální kultury na CCFA po 3 dnech při 37 °C, bylo testováno testem C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®. Pro tuto analýzu byly odebrány jednotlivé kolonie a rozmíchány v ředicím roztoku, jak je doporučeno pro vzorky stolice. Všech 103 izolátů vedlo k pozitivní reakci v testu.

Sedmdesát ze 103 izolátů (68 %) bylo z vzorků stolice, které byly pozitivní na toxin *C. difficile* analýzou tkáňové kultury. Z nich dalo 56 (80 %) pozitivní reakci na toxin při vyšetřování následného anaerobního růstu na CCFA po 3 dny při 37 °C.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

TILSIGTET ANVENDELSE

Testen TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* er en hurtig membran-enzym-immunassay til samtidig påvisning af *Clostridium difficile*-antigenet glutamatdehydrogenase samt toksin A og B i en enkelt reaktionsbrønd. Testen påviser *C. difficile*-antigenet glutamatdehydrogenase som en screening for forekomst af *C. difficile* og bekræfter forekomst af toksigen *C. difficile* ved at påvise toksin A og B i fæcesprøver fra personer, der mistænkes for at have *C. difficile*-sygdom. Testen skal anvendes som en hjælp ved diagnosticering af *C. difficile*-sygdom. Som ved andre *C. difficile*-test skal resultaterne betragtes i sammenhæng med patientens sygehistorie.

FORKLARING

Efter behandling med antibiotika udvikler mange patienter gastrointestinale problemer spændende fra mild diare til svær pseudomembranøs kolit. Mange tilfælde af de mildere former for gastrointestinal sygdom og de fleste tilfælde af pseudomembranøs kolit skyldes toksigene stammer af *Clostridium difficile* (1). Denne organisme er en opportunistisk anaerob bakterie, som vokser i tarmen, når den normale flora er blevet ændret af antibiotika. Toksigene stammer af *C. difficile* bærer generne, der koder for toksinerne, mens ikke-toksigene stammer ikke bærer toksingenerne. Sygdomsdebut er associeret med toksinerne, som produceres af den toksigene organisme. De kliniske symptomer, der er forbundet med sygdommen, menes primært at skyldes toksin A, som er et vævsbeskadigende enterotoksin (2,3).
C. difficile producerer desuden endnu et toksin, der benævnes toksin B. Toksin B, der er blevet omtalt som organismens cytotoksin, er det toksin, der påvises ved hjælp af den vævsdyrkningsassay, der for tiden anvendes af mange laboratorier. Toksigene *C. difficile*-stammer producerer begge toksiner eller kun toksin B (4-7). Glutamatdehydrogenasen fra *C. difficile* er en god antigenmarkør for organismen i fæces, fordi den produceres i store mængder af alle stammer, toksigene såvel som ikke-toksigene (8-10). Antigenet kan påvises i fæcesprøver ved hjælp af testen *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Et positivt resultat ved testen for glutamatdehydrogenase fra *C. difficile* bekræfter forekomst af denne organisme i fæcesprøver; et negativt resultat indikerer fravær af organismen. Et positivt resultat ved testen for toksin A og B bekræfter forekomst af toksigen *C. difficile*.

TESTPRINCIP

Testen *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* bruger antistoffer, der er specifikke for glutamatdehydrogenase og toksin A og B fra *C. difficile*. Enheden indeholder et reaktionsvindue med tre lodrette linjer af immobiliserede antistoffer. Antigentestlinjen (”Ag”) indeholder antistoffer mod *C. difficile*-glutamatdehydrogenase. Kontrollinjen (”C”) er en punkteret linje, som indeholder peberrodsperoxidase-antistoffer (HRP-antistoffer). Testlinjen for toksinerne A og B (”Tox”) indeholder antistoffer mod *C. difficile*-toksinerne A og B. *Konjugatet* består af antistoffer over for glutamatdehydrogenase og antistoffer over for toksin A og B koblet til peberrodsperoxidase. For at udføre testen tilsættes prøven til et glas indeholdende en blanding af *diluent* og *konjugat*. Den fortyndede blanding af prøve og konjugat tilsættes *prøvebrønden,* og enheden får lov til at inkubere ved rumtemperatur i 15 minutter. Under inkubationen binder eventuel glutamatdehydrogenase og toksin A og B i prøven sig til antistof-peroxidase-konjugaterne. Antigen-antistof-konjugatkomplekserne migrerer igennem en filterpude til en membran, hvor de opfanges af de immobiliserede glutamatdehydrogenase-specifikke og toksin A- og B-specifikke antistoffer i linjerne. *Reaktionsvinduet* vaskes efterfølgende med *vaskebuffer* efterfulgt af tilsætning af *substrat*. Efter en inkubationsperiode på 10 minutter undersøges ”Ag”-reaktionen visuelt for fremkomst af en lodret blå linje på ”Ag”-siden af *reaktionsvinduet*. En blå linje indikerer en positiv test. Hvis ”Ag” er positiv, skal ”Tox”-reaktionen undersøges visuelt for fremkomst af en lodret blå linje på ”Tox”-siden af *reaktionsvinduet*. En blå linje indikerer en positiv test. En positiv ”C”-reaktion indikeret af en lodret, punkteret blå linje under ”C”-delen af *reaktionsvinduet* bekræfter, at testen fungerer korrekt, og at resultaterne er valide.

LEVEREDE MATERIALER

MEM | DEV — ***Membranenheder*** – hver pose indeholder 1 enhed

DIL | SPE — ***Diluent* (22 ml pr. flaske)** – Proteinopløsning tilsat buffer med måle pipette monteret (indeholder 0,05 % ProClin® 300)*

WASH | REAG — ***Vaskebuffer* (12 ml pr. flaske)** – Opløsning tilsat buffer med målepipette monteret (indeholder 0,05 % ProClin® 300)*

SUBS | REAG — ***Substrat* (3,5 ml pr. flaske)** – Opløsning indeholdende tetramethylbenzidin

CONJ | ENZ — ***Konjugat* (2,5 ml pr. flaske)** – Monoklonalt museantistof specifikt for glutamatdehydrogenase koblet til peberrodsperoxidase og polyklonale gedeantistoffer specifikke for toksin A og B koblet til peberrodsperoxidase i en proteinopløsning med buffer (indeholder 0,05 % ProClin® 300)*

CONTROL | + — ***Positiv kontrol* (2 ml)** – Antigen i en proteinopløsning med buffer

Transferpipetter af plast til engangsbrug – skalainddeling ved 25 µl, 400 µl og 500 µl

IVD — Til *in vitro*-diagnostisk brug

*Signalord: Advarsel
H317: Kan forårsage allergisk hudreaktion
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

NØDVENDIGE MATERIALER OG UDSTYR SOM IKKE MEDFØLGER

Små prøveglas (f.eks. Eppendorf-rør af plast eller glasrør)

Applikatorpinde	*Timer*	*Vortex-mikser*
Engangshandsker til håndtering af fæcesprøver	*Pipettor og spidser*	

HOLDBARHED OG OPBEVARING

Udløbsdatoen for kittet findes på etiketten. Udløbsdatoer for hver komponent er anført på de enkelte etiketter. Kittet skal opbevares ved 2° C til 8° C.

SIKKERHEDSFORANSTALTNINGER

1. Reagenser fra forskellige kit må ikke blandes eller ombyttes. Et kit må ikke anvendes efter udløbsdatoen.
2. Enhver komponent i kittet skal efterses for eventuelle tegn på lækage. Ved ankomsten skal kittet efterses for at sikre, at komponenterne ikke er frosne eller varme ved berøring som følge af ukorrekte forsendelsesforhold.
3. Lad alle komponenter få RUMTEMPERATUR FØR BRUG!

4. Hætter, spidser og pipetteenheder er farvemærkede og må IKKE blandes eller ombyttes!
5. Reagenserne må ikke fryses. Kittet skal opbevares ved 2° C til 8° C.
6. Posen, der indeholder *membranenheden*, skal have rumtemperatur før åbning. Hold membranenheden tør før brug.
7. Brug fæcesprøver inden for 72 timer efter indhentningen for at opnå optimale resultater. Prøver, som fryses, kan miste aktivitet som følge af nedfrysning og optøning. Hvis der anvendes frosne prøver, skal de optøs ved rumtemperatur.
8. Hold reagensflasker lodret ved dispensering af reagenser for at sikre ensartet dråbestørrelse og korrekt volumen.
9. Prøver og membranenheder skal håndteres og bortskaffes som potentielt biologisk skadelige efter brug.
10. Membranenheder kan ikke genbruges.
11. Testen er optimeret med hensyn til følsomhed og specificitet. Ændringer af den angivne procedure og/eller af testforhold kan påvirke testens følsomhed og specificitet. Afvig ikke fra den angivne procedure.
12. Vær opmærksom på den totale analysetid, når der testes mere end en fæcesprøve. Tilsæt *diluent* først, og tilsæt derefter *konjugatet* til hvert glas med *diluent*. Tilsæt så prøve til glasset med *diluent/konjugat*. Bland alle de fortyndede prøver grundigt, og overfør dem til *membranenheden*. Inkubationstrinnet på 15 minutter begynder, når den sidste fortyndede blanding af prøve og konjugat er blevet overført til den sidste *membranenhed*.
13. Hvis *substrat*-reagenset ændrer sig til en mørkeblå/violet farve, tilkaldes teknisk service med henblik på udskiftning.
14. Fæcesprøver kan indeholde potentielt infektiøse stoffer og skal håndteres på "Biosikkerhedsniveau 2" som anbefalet i CDC/NIH-brugerhåndbogen "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories."
15. Alle reagenser er kun til *in vitro*-diagnostisk brug.
16. Brug engangshandsker, når testen udføres.
17. Reagenserne indeholder 0,05 % ProClin® 300 som konserveringsmiddel. Selv om koncentrationen er lav, vides ProClin® 300 at være skadelig. Hvis der opstår hudirritation eller udslæt, skal der søges lægehjælp. Forurenet tøj tages af og vaskes, før det bruges igen. Håndtér reagenser i henhold til de eksisterende bestemmelser for laboratoriesikkerhed og god laboratoriepraksis. Sikkerhedsdatablade for dette produkt fås på anmodning, kontakt teknisk support.
18. Følg henholdsvis de nationale, regionale og lokale forordninger vedrørende bestemmelserne for bortskaffelse af affald.

INDHENTNING, HÅNDTERING OG OPBEVARING AF FÆCESPRØVER

Acceptable prøvetyper
Friske fæcesprøver
Frosne fæcesprøver
Prøver i transportmedier (Cary Blair, C&S)

Brug ikke
Fæcesprøver i formalinbaseret fiksativ (f.eks. natrium-macetatformalin, 10 % formalin, merthiolatformalin)
Fæcesprøver i alkoholbaseret fiksativ (f.eks. poly-vinylalkohol)

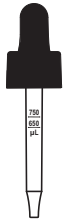
Prøveopbevaring Temperatur	Acceptabel opbevaringstid	Kommentarer
2° C–8° C	72 timer	Ideelle prøver er mindre end 24 timer gamle
Frosset ≤ -10° C	Mere end 72 timer	Optøs ved rumtemperatur. Nedfrysning og optøning flere gange kan resultere i tab af prøveaktivitet som følge af toksinnedbrydning.

1. Standardindsamlings- og håndteringsprocedurer, der anvendes internt til fæcesprøver, er egnede.
2. Fæcesprøver skal indsamles i rene, tætte beholdere.
3. Opbevaring af fæcesprøver i *diluenten* anbefales IKKE.
4. Lad ikke fæcesprøverne blive i *diluent/konjugat*-blandingen i >24 timer.

PRØVEKLARGØRING

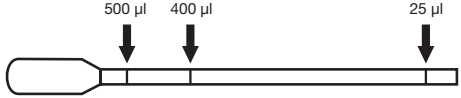
1. Lad alle reagenser og det nødvendige antal enheder få rumtemperatur før brug. Det anbefales at fjerne reagenserne fra skumindsatsen for at reducere den tid, der er nødvendig for at opvarme dem til rumtemperatur.
2. Klargør og mærk ét lille prøveglas for hver prøve og valgfrie eksterne kontroller som nødvendigt
3. Med brug af den sorte monterede målepipette tilsættes 750 µl (2 skalainddeling fra spidsen) *diluent* til hvert glas til fæcesprøver. **For prøver i transportmedier så som Cary Blair eller C&S tilsættes 650 µl (første målemærke fra spidsen) *diluent* til glasset.**

Prøvetype	*Diluent*volumen
Friske fæcesprøver	750 µl (2 skalainddeling fra spidsen)
Frosne fæcesprøver (frosne ufortyndede)	750 µl (2 skalainddeling fra spidsen)
Prøver i transportmedier (Cary Blair, C&S)	650 µl (første målemærke fra spidsen)
Eksterne kontroller (positive og negative)	750 µl (2 skalainddeling fra spidsen)



4. Tilsæt én dråbe *konjugat* (flaske med rød hætte) til hvert glas.
5. Tag én transferpipette af plast (leveret med kittet) til hver prøve – pipetterne har ophøjede skalainddelinger ved 25 µl, 400 µl og 500 µl.

Skalainddelt transferpipette



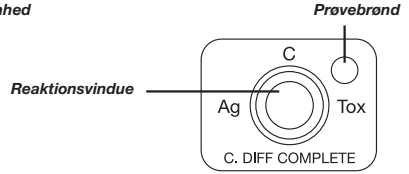
6. **Bland alle prøver grundigt uanset konsistens - det er afgørende, at prøverne er opslæmmet ensartet før overførsel.**
   Flydende/halvfaste prøver – pipetter 25 µl prøve med en transferpipette, og dispenser til *diluent/konjugat*-blandingen. Brug den samme transferpipette til at blande den fortyndede prøve.
   Formede/faste prøver – Vær omhyggelig med at tilsætte den korrekte mængde formet fæces til prøveblandingen. Bland prøven grundigt ved hjælp f en applikatorpind af træ, og overfør en lille del (ca. 2 mm i diameter, svarende til 25 µl) af prøven til diluent/konjugat-blandingen. Emulger prøven ved hjælp af applikatorpinden.
   Fæcesprøver i transportmediet Cary Blair eller C&S - pipetter 100 µl (2 dråber fra transferpipette) af prøven til *diluent/konjugat*-blandingen.

7. **Valgfrie eksterne kontrolprøver:**
   Ekstern positiv kontrol - tilsæt én dråbe *positiv kontrol* (flaske med grå hætte) til *diluent/konjugat*-blandingen.
   Ekstern negativ kontrol - tilsæt 25 µl *diluent* til *diluent/konjugat*-blandingen.

BEMÆRK Hvis der overføres for lidt prøve, eller hvis blanding og fuldstændig opslemning af prøven i diluent/konjugat-blandingen mislykkes, kan det resultere i et falsk negativt testresultat. Tilsætning af for meget fæcesprøve kan medføre ugyldige resultater som følge af begrænset prøveflow.

TESTPROCEDURE

1. Tag én *membranenhed* pr. prøve og én enhed pr. valgfri ekstern positiv eller negativ kontrol som nødvendigt. Folieposerne indeholdende enhederne skal varmes op til rumtemperatur før åbning. Brug enheden straks efter åbningen. Mærk hver enhed behørigt, og anbring den på en plan flade, så det trykte "C. DIFF COMPLETE" er nederst på enheden, og så den lille prøvebrønd befinder sig i øverste højre hjørne af enheden.

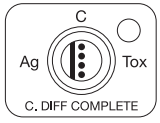


2. Luk hvert glas med fortyndet prøve, og bland grundigt. Korrekt blanding kan opnås ved at svinge glasset rundt eller vende det på hovedet. Når en patientprøve eller *positiv kontrol* er blevet fortyndet i *diluent/konjugat*-blandingen, kan den inkuberes ved rumtemperatur i et hvilket som helst tidsrum op til 24 timer før tilsætning til *membranenheden*.
3. Brug en ny transferpipette, og overfør 500 µl af den fortyndede blanding af prøve og konjugat til *membranenhedens* ***prøvebrønd*** (det mindste hul i det øverste højre hjørne af enheden), idet man sikrer sig, at den flydende prøve udtømmes på puden med vægevirkning inden i *membranenheden*. Når prøven fyldes i prøvebrønden skal man sikre sig, at spidsen af transferpipetten har en skrå retning mod *reaktionsvinduet* (største hul i midten af enheden).
4. Enheden inkuberes ved rumtemperatur i 15 minutter – prøven vil trække væske igennem enheden, og et vådt område vil sprede sig hen over *reaktionsvinduet*.
   BEMÆRK ANGÅENDE PRØVER, HVOR VANDRING MISLYKKES:
   Nu og da vandrer en fortyndet prøve ikke rigtigt, og reaktionsvinduet bliver ikke helt vådt. Hvis reaktionsvinduet ikke ser ud til at blive helt vådt inden for 5 minutter efter tilsætning af prøven til prøvebrønden, tilsættes 100 µl (4 dråber) diluent til prøvebrønden. Vent yderligere 5 minutter (i i alt 20 minutter).
5. Efter inkuberingen tilsættes 300 µl *vaskebuffer* til ***reaktionsvinduet*** ved hjælp af den monterede hvide målepipette. Lad *vaskebufferen* løbe igennem reaktionsvinduets membran og blive absorberet fuldstændigt.
6. Tilsæt 2 dråber *substrat* (flaske med hvid hætte) til ***reaktionsvinduet***. Aflæs og registrer resultaterne visuelt efter 10 minutter.

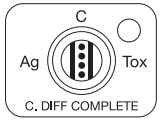
TOLKNING AF RESULTATER

1. Tolkning af testen er mest pålidelig, når enheden aflæses straks ved slutningen af reaktionsperioden på 10 minutter. Aflæs enheden i normal arbejdsafstand i et godt oplyst område. Se på den med en sigtelinje lige over enheden.
2. Iagttag enheden med henblik på fremkomst af blå prikker midt i *reaktionsvinduet*, som repræsenterer den interne positive kontrol. Fremkomsten af eventuel(le) kontrolprik(ker) repræsenterer en valid intern kontrol. Baggrundens farve kan vise sig som hvid til lys blå. Iagttag enheden for fremkomst af blå linjer på "Ag"- og "Tox"-siderne af *reaktionsvinduet*, som repræsenterer testlinjerne. Linjernes intensitet kan fremstå som svag til mørk.
3. **Positivt antigenresultat ("Ag").** Et positivt antigenresultat kan tolkes på et hvilket som helst tidspunkt mellem tilsætningen af *substrat* og den 10-minutters aflæsningstid. Ved et positivt antigenresultat er den blå "Ag"-linje og den punkterede blå kontrollinje under "C" synlige (Figur 1a). Linjernes intensitet kan fremstå som svag til mørk. En tydeligt partiel linje tolkes som et positivt resultat. Membranmisfarvning må ikke tolkes som et positivt resultat. Et positivt resultat indikerer forekomst af *C. difficile*.
4. **Positivt antigen- og toksinresultat ("Tox"):** Hvis antigenresultatet er positivt (dvs. hvis der ses en blå "Ag"-linje og en punkteret blå kontrol under "C"), fortsætter man til tolkningen af toksinresultatet. Et positivt toksinresultat kan tolkes på et hvilket som helst tidspunkt mellem tilsætningen af *substrat* og den 10-minutters aflæsningstid. Ved et positivt toksinresultat ses en blå "Tox"-linje (Figur 1b). Linjens intensitet kan fremstå som svag til mørk. En tydeligt partiel linje tolkes som et positivt resultat. Membranmisfarvning må ikke tolkes som et positivt resultat. Et positivt resultat indikerer forekomst af *C. difficile*-toksin.
5. **Negativt resultat:** En test kan ikke tolkes som negativ eller ugyldig før 10 minutter efter tilsætningen af *substrat*. Der ses en enkelt blå punkteret linje midt i *reaktionsvinduet,* under "C", og der ses ingen testlinjer på "Ag"-siden eller "Tox"-siden af *reaktionsvinduet* (Figur 1c). Et negativt resultat i antigendelen indikerer, at der ikke er *C. difficile*-antigen i prøven, eller at det er under testens detektionsgrænse. Et negativt resultat i toksindelen indikerer, at der ikke er C. difficile-antigen i prøven, eller at det er under testens detektionsgrænse.
6. **Ugyldigt resultat:** Der ses ingen linjer i reaktionsvinduet (Figur 1d). Testresultatet er ugyldigt, hvis der ikke findes en blå punkteret linje under "C" ved afslutningen af reaktionsperioden (Figurerne 1e, 1f og 1g).
7. **Negativt antigen ("Ag"), positivt toksin ("Tox"):** En lille procentdel af prøverne kan teste negative for antigen, men positive for toksin. Disse prøver skal betragtes som ubestemmelige og testes igen med brug af en frisk prøve (Figur 1h). Hvis prøven igen tester negativt for antigen, men positivt for toksin, skal det rapporteres som positivt toksinresultat.

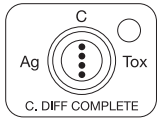
FIGUR 1: TOLKNING AF *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® RESULTATER



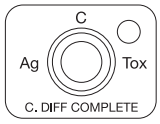
Figur 1a
Positivt antigenresultat



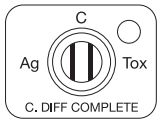
Figur 1b
Positivt antigen- og toksinresultat



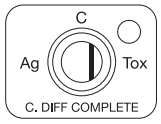
Figur 1c
Negativt resultat



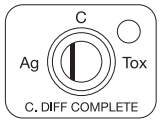
Figur 1d
Ugyldigt resultat



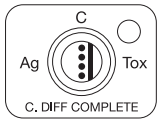
Figur 1e
Ugyldigt resultat



Figur 1f
Ugyldigt resultat



Figur 1g
Ugyldigt resultat



Figur 1h
Se nr. 7 angående tolkning

KVALITETSKONTROL

Intern: Der skal ses en punkteret blå linje midt i *reaktionsvinduet* under "C" på hver *membranenhed*, som testes. Fremkomsten af de blå kontrolprikker bekræfter, at prøven og reagenserne er blevet tilsat korrekt, at reagenserne var aktive på tidspunktet, hvor analysen blev udført, og at prøven vandrede korrekt gennem *membranenheden*. Det bekræfter desuden reaktiviteten af de andre reagenser, der er associeret med analysen. En klar baggrund i resultatområdet betragtes om en intern negativ kontrol. Hvis testen er blevet udført korrekt, og hvis reagenserne fungerer rigtigt, vil baggrunden være hvid for at give et skelneligt resultat.
Ekstern: Reaktiviteten af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® kittet skal verificeres ved modtagelsen ved hjælp af den *positive kontrol* og den negative kontrol (*diluent*). Den *positive kontrol* leveres sammen med kittet (flaske med grå hætte). Den *positive kontrol* bekræfter reaktiviteten af de andre reagenser, der er associeret med analysen, og er ikke beregnet til at sikre præcision ved analyse-cut-off. *Diluent* anvendes til den negative kontrol. Der kan udføres yderligere test med kontrollerne for at opfylde kravene i lokale, statslige og/eller forbundsstatslige bestemmelser og/eller krav fra akkrediteringsorganisationer.

BEGRÆNSNINGER

1. Testen *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® anvendes til at påvise C. difficile-antigen og -toksin(er) i fæcesprøver. Testen bekræfter forekomst af toksin i fæces, og denne information skal tages op til behandling af lægen i lyset af patientens sygehistorie og lægeundersøgelse. Testen *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® vil påvise niveauer af toksin A på ≥0,63 ng/ml, toksin B på ≥0,16 ng/ml og glutamatdehydrogenase på ≥0,8 ng/ml.
2. Fæcesprøver er ekstremt komplekse. Optimale resultater med testen *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® opnås med prøver, som er under 24 timer gamle. De fleste ufortyndede prøver kan opbevares ved mellem 2° C og 8° C i 72 timer, før der bemærkes væsentlig nedbrydning af toksinet Hvis prøverne ikke analyseres inden for denne tid, kan de nedfryses og optøs. Gentagen nedfrysning og optøning kan dog resultere i tab i immunreaktivitet hos antigen og toksinerne A og B.
3. Visse prøver kan give svage reaktioner. Det kan skyldes en række faktorer så som forekomst af lave niveauer af antigen og/eller toksin, forekomst af bindende stoffer eller inaktiverende enzymer i fæces. Linjernes intensitet kan fremstå som svag til mørk. Disse prøver skal rapporteres som positive, hvis der ses en blå linje, selv en partiel linje. En tydeligt partiel blå linje tolkes som et positivt resultat.
4. Fæcesprøver, der er præserveret i 10 % formalin, merthiolatformalin, natriumacetatformalin eller polyvinylalkohol kan ikke bruges.
5. Testen *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® er kvalitativ Farveintensiteten må ikke tolkes kvantitativt.
6. Visse isolater af *C. sordellii* kan reagere ved *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen som følge af produktionen af immunologisk relaterede toksiner (1).
7. Koloniseringsrater på op til 50 % er blevet rapporteret hos spædbørn. Der er også rapporteret en høj rate hos patienter med cystisk fibrose (1,3). Resultaterne kan se positive ud i disse grupper, men de skal ses i sammenhæng med muligheden for, at det er en koloniseret bærer.
8. Den eneste ikke-*C. difficile*-organisme, der reagerede i toksindelen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen, var *Clostridium sordellii* VPI 9048. Denne stamme producerer toksinerne HT og LT, som er homologe med henholdsvis toksin A og toksin B.
9. Der findes ingen data vedrørende virkningerne af colonskylninger, bariumlavementer, laksativer eller tarmudrensninger på funktionen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen. Alle disse procedurer kan resultere i kraftig fortynding eller forekomst af additiver, som kan påvirke testens funktion.

FORVENTEDE VÆRDIER

Clostridium difficile-sygdom er først og fremmest en nosokomiel sygdom hos ældre patienter, og sygdomsfrekvensen er afhængig af faktorer som patientpopulation, institutionstype og epidemiologi. Den rapporterede incidens af *C. difficile*-sygdom hos patienter med antibiotika-associeret diare kan variere fra 5 til 20 %, og hospitaler kan opleve rater, der er lavere eller højere end dette interval. Det er vigtigt at betragte alle testresultater i sammenhæng med kliniske symptomer, da nogle raske voksne og et stort antal raske spædbørn (op til 50 %) vil være positive over for *C. difficile*-toksin. Desuden er der rapporteret rater for *C. difficile*-bærere på 22 % til 32 % hos patienter med cystisk fibrose (1,3). I de forsøg, der ved hjælp af patienter med symptomer er blevet udført for denne enhed, var incidensen for toksin A og B 12 % og for GDH 18 %. Et positivt resultat i antigendelen af testen *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® bekræfter forekomsten af *C. difficile* i en fæcesprøve. Et negativt resultat indikerer, at organismen ikke findes. Et positivt resultat i toksindelen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® bekræfter forekomsten af *C. difficile*-toksin i en fæcesprøve. Et negativt resultat indikerer, at der ikke findes toksin, eller at der er utilstrækkelige niveauer af toksin til påvisning.

FINKTIONSKARAKTERISTIKA

Klinisk evaluering af antigendelen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen

Antigendelen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen blev sammenlignet med bakteriedyrkning. Prøver, der var inkluderet i evalueringen, blev indsendt til de kliniske laboratorier til rutinetestning. Den bakterielle dyrkningstest blev udført i overensstemmelse med interne procedurer. Resultaterne er vist i Tabel 1.

Tabel 1 Opsummering af klinisk funktion ved sammenligning af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen og bakteriedyrkning.

n = 1126	Bakteriedyrkning Positiv	Bakteriedyrkning Negativ
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinje positiv	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinje negativ	21	842

		95 % konfidensgrænser
Følsomhed	90,5 %	85,7–93,9
Specificitet	93,1 %	91,2–94,7
Prædiktiv positiv værdi	76,4 %	70,7–81,3
Prædiktiv negativ værdi	97,6 %	96,2–98,4
Korrelation	92,6 %	91,8–93,4

Uoverensstemmende prøver blev evalueret ved brug af gyldige ELISA-test for *C. difficile*-gluta-matdehydrogenase.
29 af de 62 falsk positive prøver var positive med en anden GDH-test og blev betragtet som sande positiver.
13 af de 21 falsk negative prøver var negative med en anden GDH-test og blev betragtet som sande negativer.

Antigendelen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen blev sammenlignet med vævsdyrkningsassay med hensyn til påvisning af C. difficile-toksin. Prøver, der var inkluderet i evalueringen, blev indsendt til de kliniske laboratorier til rutinetestning. Resultaterne er vist i Tabel 2. Antigendelen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen påviste 98,7 % af de prøver, der var positive ved vævsdyrkning.

Tabel 2 Opsummering af klinisk funktion ved sammenligning af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen og vævsdyrkningsassay.

n = 1126	Vævsdyrkning Positiv	Vævsdyrkning Negativ
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinje positiv	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinje negativ	2	861

Klinisk evaluering af toksindelen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen

Toksindelen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen blev sammenlignet med vævsdyrkningsassay på to kliniske laboratorier og internt ved TECHLAB®, Inc. Prøverne, der var inkluderet i evalueringen, blev sendt til de kliniske laboratorier til rutinetestning. Resultaterne er vist i Tabel 3.

Tabel 3 Opsummering af klinisk funktion ved sammenligning af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen og vævsdyrkningsassay.

n = 1126	Vævsdyrkning Positiv	Vævsdyrkning Negativ
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toksinlinje positiv	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toksinlinje negativ	19	964

		95 % konfidensgrænser
Følsomhed	87,8 %	81,4-92,3
Specificitet	99,4 %	98,6-99,7
Prædiktiv positiv værdi	95,8 %	90,7-98,3
Prædiktiv negativ værdi	98,1 %	96,9-98,8
Korrelation	97,8 %	97,6-98,0

Uoverensstemmende prøver blev evalueret ved brug af gyldige ELISA-test for toksin A og B.
5 af de 6 falsk positive prøver var positive med ELISA og blev betragtet som sande positiver.
12 af de 19 falsk negative prøver var negative med ELISA og blev betragtet som sande negativer.

EFFEKT AF FÆCESPRØVEKONSISTENS

Effekt af fæcesprøvekonsistens på *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen

Reaktionen af fæcesprøver af varierende konsistens i antigendelen (n=978) og toksindelen (n=981) på *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen er vist i Tabel 4 og 5. Procentdelen af positive reaktioner ved brug af enten dyrkningsassay eller *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen var næsten ens ved alle tre typer fæcesprøver (flydende, halvfast og fast). Alle prøverne blev sendt til C. difficile-testning. Baggrunden for fremsendelsen var patientens sygehistorie og ikke konsistensen af prøven. I antigendelen viser resultaterne, at *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen fungerede lig bakteriedyrkning ved test af prøver af forskellig konsistens. I toksindelen viser resultaterne, at *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen fungerede lig vævsdyrkningsassay ved test af prøver af forskellig konsistens.

Tabel 4 Reaktion af fæcesprøver af varierende konsistens i antigendelen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen

Antal prøver (n = 978)	Flydende prøver (n = 335)	Halvfaste prøver (n = 522)	Faste prøver (n = 121)
Positive ved bakteriedyrkningsassay	59 (17,6 %)	110 (21,1 %)	19 (15,7 %)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinje positiv	72 (21,5 %)	128 (24,5 %)	25 (20,7 %)
Negative ved bakteriedyrkningsassay	276 (82,4 %)	412 (78,9 %)	102 (84,3 %)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinje negativ	263 (78,5 %)	394 (75,5 %)	96 (79,3 %)

Tabel 5 Reaktion af fæcesprøver af varierende konsistens i toksindelen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen

Antal prøver (n = 981)	Flydende prøver (n = 336)	Halvfaste prøver (n = 523)	Faste prøver (n = 122)
Positive ved vævsdyrkningsassay	43 (12,8 %)	81 (15,5 %)	8 (6,6 %)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toksinlinje positiv	42 (12,5 %)	72 (13,8 %)	7 (5,7 %)
Negative ved vævsdyrkningsassay	293 (87,2 %)	442 (84,5 %)	114 (93,4 %)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toksinlinje negativ	294 (87,5 %)	451 (86,2 %)	115 (94,3 %)

ANALYSEFØLSOMHED

Cut-off for analysen blev fastsat til koncentrationer på 0,63 ng/ml for toksin A, 0,16 ng/ml for toksin B og 0,8 ng/ml for glutamatdehydrogenase.

REPRODUCERBARHED

Reproducerbarheden af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen blev bestemt ved brug af 12 fæcesprøver, som blev kodet for at forhindre identifikation af dem under testning. Testningen blev udført ved 3 uafhængige laboratorier, som testede prøverne i 3 dage. Prøverne frembragte de forventede resultater 100 % af tiden.

KRYDSREAKTION

Fæcesprøver inokuleret med de følgende mikroorganismer til en slutkoncentration på omkring 10^8 organismer pr. ml eller derover reagerede ikke i antigen- eller toksindelen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen:

Bakterie eller patogen: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (ikke-toksigen)*, Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC*, Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7*, Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans)*, Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

Den eneste ikke-*C. difficile*-organisme, der reagerede i toksindelen af *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen, var *Clostridium sordellii* VPI 9048. Denne stamme producerer toksinerne HT og LT, som er homologe med henholdsvis toksin A og toksin B.

De følgende vira på $10^{3,3}$ til $10^{8,25}$ TCID-enheder pr. 0,2 ml reagerede ikke ved *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen:

Vira: Adenovirus type 1, 2, 3, 5, 40, 41, Humant coronavirus, Coxsackievirus B2, B3, B4, B5, Echovirus 9, 11, 18, 22, 33, Enterovirus type 68, 69, 70, 71, Rotavirus.

FORSTYRRENDE STOFFER

De følgende stoffer (USA-formulering) havde ingen virkning på testresultaterne, når de fandtes i fæces i de angivne koncentrationer: Mucin (3,5 % w/v), humant blod (40 % v/v), bariumsulfat (5 % w/v), Imodium® (5 % v/v), Kaopectate® (5 % v/v), Pepto-Bismol® (5 % v/v), stearin-/palmitinsyre (40 % w/v), Metronidazol (0,25 % w/v), Vancomycin (0,25 % w/v).

REAKTION AF KLINISKE ISOLATER OPNÅET PÅ CYCLOSERIN-CEFOXITIN-FRUKTOSE-AGAR (CCFA)

I alt 103 kliniske isolater af *C. difficile* opnået ved anaerob bakteriedyrkning på CCFA efter 3 dage ved 37° C blev testet med *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testen. Til analysen blev der udvalgt individuelle kolonier, som blev opslæmmet i *diluent* som anbefalet for fæcesprøver. Alle 103 isolater gav en positiv antigenrekation ved testen.

70 af 103 isolater (68 %) var fra fæcesprøver, som var positive med hensyn til *C. difficile* -toksin ved vævsdyrkningsassay. Af disse gav 56 (80 %) en positiv toksinreaktion ved screening efter anaerob vækst på CCFA i 3 dage ved 37° C.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

ΕΝΔΕΔΕΙΓΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η εξέταση TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* είναι μια ταχεία ανάλυση ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού σε μεμβράνη για την ταυτόχρονη ανίχνευση του αντιγόνου «γλουταμικής δεσυδρογονάσης» του *Clostridium difficile* και των τοξινών Α και Β σε μία κυψελίδα αντίδρασης. Η εξέταση ανιχνεύει το αντιγόνο του *C. difficile*, γλουταμική δεσυδρογονάση, ως απόδειξη για την παρουσία του *C. difficile* και επιβεβαιώνει την παρουσία τοξικογόνου *C. difficile* ανιχνεύοντας τις τοξίνες Α και Β σε δείγματα κοπράνων ατόμων για τα οποία υπάρχει υποψία ότι πάσχουν από νόσο που σχετίζεται με το *C. difficile*. Η εξέταση προορίζεται για χρήση ως βοήθημα στη διάγνωση νόσου που σχετίζεται με το *C. difficile*. Όπως συμβαίνει με άλλες εξετάσεις για το *C. difficile*, τα αποτελέσματα θα πρέπει να μελετώνται σε συνδυασμό με το ιστορικό του ασθενούς.

ΕΞΗΓΗΣΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Μετά από την αγωγή με αντιβιοτικά, πολλοί ασθενείς αναπτύσσουν προβλήματα του γαστρεντερικού τα οποία κυμαίνονται από ήπια διάρροια μέχρι ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα. Πολλές περιπτώσεις ηπιότερων μορφών των γαστρεντερικών νοσημάτων και οι περισσότερες περιπτώσεις της ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας προκαλούνται από τοξικογόνα στελέχη του *Clostridium difficile* (1). Αυτός ο οργανισμός είναι ένα ευκαιριακό αναερόβιο βακτήριο το οποίο αναπτύσσεται στο έντερο μόλις η φυσιολογική χλωρίδα αλλοιωθεί από το αντιβιοτικό. Τα τοξικογόνα στελέχη του *C. difficile* φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις τοξίνες, ενώ τα μη τοξικογόνα στελέχη δεν φέρουν γονίδια τοξινών. Η εκδήλωση της νόσου σχετίζεται με τις τοξίνες που παράγονται από τον τοξικογόνο οργανισμό. Τα κλινικά συμπτώματα που σχετίζονται με τη νόσο θεωρείται ότι οφείλονται κυρίως στην τοξίνη Α, η οποία είναι μια εντεροτοξίνη που καταστρέφει τον ιστό (2,3). Το *C. difficile* παράγει επίσης μια δεύτερη τοξίνη, την προσδιορισμένη τοξίνη Β. Η τοξίνη Β, η οποία έχει αναφερθεί ως η κυτταροτοξίνη του οργανισμού, είναι η τοξίνη που ανιχνεύεται από την ανάλυση της ιστοκαλλιέργειας η οποία χρησιμοποιείται επί του παρόντος από πολλά εργαστήρια. Τα τοξικογόνα στελέχη του *C. difficile* παράγουν και τις δύο τοξίνες ή μόνο την τοξίνη Β (4-7). Η γλουταμική δεσυδρογονάση του *C. difficile* αποτελεί έναν καλό δείκτη αντιγόνου για αυτόν τον οργανισμό στα κόπρανα, επειδή παράγεται σε υψηλά ποσοστά από όλα τα στελέχη, τοξικογόνα ή μη τοξικογόνα (8-10). Το αντιγόνο μπορεί να ανιχνευτεί σε δείγματα κοπράνων με χρήση της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Το θετικό αποτέλεσμα της εξέτασης για τη γλουταμική δεσυδρογονάση του *C. difficile* επιβεβαιώνει τη παρουσία αυτού του οργανισμού σε δείγμα κοπράνων, ενώ το αρνητικό αποτέλεσμα υποδεικνύει την απουσία του οργανισμού. Το θετικό αποτέλεσμα της εξέτασης για τις τοξίνες Α και Β επιβεβαιώνει την παρουσία τοξικογόνου *C. difficile*.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Η εξέταση *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* χρησιμοποιεί ειδικά αντισώματα για τη γλουταμική δεσυδρογονάση και τις τοξίνες Α και Β του *C. difficile*. Η συσκευή περιέχει ένα παράθυρο αντίδρασης με τρεις κατακόρυφες γραμμές ακινητοποιημένων αντισωμάτων. Η γραμμή εξέτασης αντιγόνου («Ag») περιέχει αντισώματα έναντι της γλουταμικής δεσυδρογονάσης του *C. difficile*. Η γραμμή ελέγχου («C») είναι μια διάστικτη γραμμή που περιέχει αντισώματα υπεροξειδάσης από ραφανίδα (HRP). Η γραμμή εξέτασης τοξινών Α και Β («Tox») περιέχει αντισώματα έναντι των τοξινών Α και Β του *C. difficile*. Το *σύζευγμα* περιέχει αντισώματα έναντι της γλουταμικής δεσυδρογονάσης και αντισώματα έναντι των τοξινών Α και Β συζευγμένα με υπεροξειδάση από ραφανίδα. Για την εκτέλεση της εξέτασης, το δείγμα προστίθεται σε έναν σωλήνα που περιέχει ένα μείγμα *αραιωτικού* και *συζεύγματος*. Το μείγμα αραιωμένου δείγματος-συζεύγματος προστίθεται στην *κυψελίδα δείγματος* και η συσκευή επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης, τυχόν γλουταμική δεσυδρογονάση και τοξίνες Α και Β που υπάρχουν στο δείγμα δεσμεύονται στα συζεύγματα αντισωμάτων-υπεροξειδάσης. Τα συμπλέγματα συζεύγματος αντιγόνου-αντισωμάτων μετακινούνται μέσω ενός φιλτρόπανου σε μια μεμβράνη όπου δεσμεύονται από τα ακινητοποιημένα ειδικά αντισώματα για τη γλουταμική δεσυδρογονάση και τις τοξίνες Α και Β στις γραμμές. Κατόπιν, το *παράθυρο αντίδρασης* πλένεται με *ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης* και, στη συνέχεια, προστίθεται το *υπόστρωμα*. Μετά από επώαση 10 λεπτών, η αντίδραση «Ag» εξετάζεται οπτικά για την εμφάνιση μια κατακόρυφης μπλε γραμμής στην πλευρά «Ag» του *παραθύρου αντίδρασης*.

Η μπλε γραμμή υποδεικνύει θετικό αποτέλεσμα της εξέτασης. Αν η αντίδραση «Ag» είναι θετική, τότε πρέπει να εξεταστεί οπτικά η αντίδραση «Tox» για την εμφάνιση μια μπλε γραμμής στην πλευρά «Tox» του *παραθύρου αντίδρασης*. Η μπλε γραμμή υποδεικνύει θετικό αποτέλεσμα της εξέτασης. Η θετική αντίδραση «C», η οποία υποδεικνύεται από μια κατακόρυφη διάστικτη μπλε γραμμή κάτω από το τμήμα «C» του *παραθύρου αντίδρασης*, επιβεβαιώνει ότι η εξέταση λειτουργεί σωστά και τα αποτελέσματα είναι έγκυρα.

ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

MEM | DEV — ***Μεμβρανικές συσκευές*** – κάθε θύλακας περιέχει 1 συσκευή

DIL | SPE — ***Αραιωτικό* (22 mL ανά φιάλη)** – Ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνης με διαβαθμισμένο σταγονόμετρο (περιέχει 0,05% ProClin® 300)*

WASH | REAG — ***Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης* (12 mL ανά φιάλη)** – Ρυθμιστικό διάλυμα με διαβαθμισμένο σταγονόμετρο (περιέχει 0,05% ProClin® 300)*

SUBS | REAG — ***Υπόστρωμα* (3,5 mL ανά φιάλη)** – Διάλυμα που περιέχει τετραμεθυλοβενζιδίνη

CONJ | ENZ — ***Σύζευγμα* (2,5 mL ανά φιάλη)** – Ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού για τη γλουταμική δεσυδρογονάση συζευγμένο με υπεροξειδάση από ραφανίδα και ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα αίγας για τις τοξίνες Α και Β συζευγμένα με υπεροξειδάση από ραφανίδα σε ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνης (περιέχει 0,05% ProClin® 300)*

CONTROL | + — ***Θετικός ορός ελέγχου* (2 mL)** – Αντιγόνο σε ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεΐνης

Πλαστικές πιπέτες μεταφοράς μίας χρήσης – διαβαθμισμένες στα 25 μL, 400 μL και 500 μL

IVD — Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

*Προειδοποιητική λέξη: Προειδοποίηση
H317: Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες (π.χ. πλαστικοί σωλήνες Eppendorf ή γυάλινοι σωλήνες)
Ραβδία εφαρμογής *Χρονόμετρο* *Αναμείκτης vortex*
Γάντια μίας χρήσης για χειρισμό των δειγμάτων κοπράνων *Σύστημα πιπετών και ρύγχη*

ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Η ημερομηνία λήξης του κιτ αναφέρεται στην ετικέτα. Η ημερομηνία λήξης για κάθε συστατικό αναφέρεται στην ξεχωριστή ετικέτα του συστατικού. Το κιτ πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία μεταξύ 2°C και 8°C.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

1. Μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικά κιτ και μην τα εναλλάσσετε μεταξύ τους. Μην χρησιμοποιείτε ένα κιτ μετά το πέρας της ημερομηνίας λήξης.
2. Κάθε συστατικό του κιτ πρέπει να ελέγχεται για τυχόν ενδείξεις διαρροής. Κατά την άφιξη του κιτ, ελέγξτε το για να βεβαιωθείτε ότι τα συστατικά δεν είναι παγωμένα ή θερμά στην αφή λόγω ακατάλληλων συνθηκών αποστολής.

3. Αφήστε όλα τα συστατικά να έρθουν σε ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ!
4. Τα πώματα, τα ρύγχη και τα σταγονόμετρα φέρουν χρωματική κωδικοποίηση. ΜΗΝ τα αναμειγνύετε και ΜΗΝ τα εναλλάσσετε μεταξύ τους!
5. Μην ψύχετε τα αντιδραστήρια. Το κιτ πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία μεταξύ 2°C και 8°C.
6. Ο θύλακας που περιέχει τη *μεμβρανική συσκευή* πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από το άνοιγμα. Διατηρείτε τις μεμβρανικές συσκευές στεγνές πριν από τη χρήση.
7. Χρησιμοποιείτε τα δείγματα κοπράνων εντός 72 ωρών από τη συλλογή τους για να επιτύχετε τα βέλτιστα αποτελέσματα. Τα δείγματα που έχουν ψυχθεί ενδέχεται να χάσουν τη δραστικότητά τους λόγω της ψύξης και της απόψυξης. Σε περίπτωση χρήσης κατεψυγμένων δειγμάτων, αποψύξτε τα σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Διατηρείτε τις φιάλες αντιδραστηρίων σε κατακόρυφη θέση κατά τη διανομή, προκειμένου να εξασφαλίσετε ότι η παροχή πραγματοποιείται με συνέπεια στο μέγεθος των σταγόνων και σε σωστό όγκο.
9. Πρέπει να χειρίζεστε και να απορρίπτετε τα δείγματα και τις μεμβρανικές συσκευές ως δυνητικώς βιοεπικίνδυνα υλικά μετά από τη χρήση τους.
10. Δεν είναι δυνατή η εκ νέου χρήση των μεμβρανικών συσκευών.
11. Η εξέταση έχει βελτιστοποιηθεί για τη επίτευξη ευαισθησίας και ειδικότητας. Τυχόν τροποποιήσεις της καθορισμένης διαδικασίας ή/και των προϋποθέσεων της εξέτασης ενδέχεται να επηρεάσουν την ευαισθησία και την ειδικότητα της εξέτασης. Μην αποκλίνετε από την καθορισμένη διαδικασία.
12. Δώστε προσοχή στο συνολικό χρόνο της ανάλυσης κατά την εξέταση περισσότερων του ενός δειγμάτων κοπράνων. Προσθέστε πρώτα το *αραιωτικό* και, στη συνέχεια, προσθέστε το *σύζευγμα* σε κάθε σωλήνα *αραιωτικού*. Κατόπιν, προσθέστε το δείγμα στο σωλήνα του *αραιωτικού/συζεύγματος*. Αναμείξτε διεξοδικά όλα τα αραιωμένα δείγματα και μεταφέρετέ τα στη *μεμβρανική συσκευή*. Το βήμα της 15λεπτης επώασης πρέπει να ξεκινήσει αφού έχετε μεταφέρει και το τελευταίο αραιωμένο μείγμα δείγματος-συζεύγματος στην τελευταία *μεμβρανική συσκευή*.
13. Αν το αντιδραστήριο *υποστρώματος* γίνει σκούρο μπλε/μωβ, επικοινωνήστε με την τεχνική υποστήριξη για αντικατάσταση.
14. Τα δείγματα κοπράνων ενδέχεται να περιέχουν δυνητικώς λοιμογόνους παράγοντες και δεν πρέπει να υποβάλλονται σε χειρισμό στο «Επίπεδο βιοασφάλειας 2», όπως συνιστάται στο εγχειρίδιο «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories» (Βιοασφάλεια σε μικροβιολογικά και βιοϊατρικά εργαστήρια) του Κέντρου ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων (CDC) /Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας (NIH) των Η.Π.Α.
15. Όλα τα αντιδραστήρια προορίζονται μόνο για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
16. Φοράτε γάντια μιας χρήσης κατά την εκτέλεση της εξέτασης.
17. Τα αντιδραστήρια περιέχουν 0,05% ProClin® 300 ως συντηρητικό. Αν και η συγκέντρωση είναι χαμηλή, το ProClin® 300 είναι γνωστό ότι είναι επιβλαβές. Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Συμβουλευθείτε / Επισκεφθείτε γιατρό. Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετέ τα πριν τα ξαναχρησιμοποιήσετε. Χειρίζεστε τα αντιδραστήρια σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς για την ασφάλεια του εργαστηρίου και τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές. Τα Δελτία δεδομένων ασφαλείας για αυτό το προϊόν είναι διαθέσιμα κατόπιν αιτήματος. Επικοινωνήστε με την τεχνική υποστήριξη.
18. Τηρείτε τις εθνικές, περιφερειακές και τοπικές διατάξεις αντιστοίχως για την απόρριψη των αποβλήτων.

ΣΥΛΛΟΓΗ, ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ

Αποδεκτοί τύποι δειγμάτων
Νωπά δείγματα κοπράνων
Κατεψυγμένα δείγματα κοπράνων
Δείγματα σε υλικά μεταφοράς (Cary Blair, C&S)

Μην χρησιμοποιείτε
Δείγματα κοπράνων σε μονιμοποιητικό διάλυμα με βάση τη φορμαλίνη (π.χ. φορμαλίνη με οξικό νάτριο, 10% φορμαλίνης, φορμαλίνη merthiolate)
Δείγματα κοπράνων σε μονιμοποιητικό διάλυμα με βάση το οινόπνευμα (π.χ. πολυβινυλο-αλκοόλη)

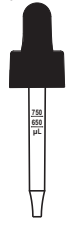
Θερμοκρασία φύλαξης δείγματος	Αποδεκτή διάρκεια φύλαξης	Παρατηρήσεις
2°C – 8°C	72 ώρες	Τα ιδανικά δείγματα είναι εκείνα που έχουν συλλεχθεί πριν από χρονικό διάστημα μικρότερο των 24 ωρών
Κατεψυγμένα ≤ -10°C	Μεγαλύτερη από 72 ώρες	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Η επανειλημμένη ψύξη και απόψυξη ενδέχεται να οδηγήσει σε απώλεια της δραστικότητας των δειγμάτων λόγω αλλοίωσης των τοξινών.

1. Ενδείκνυνται οι τυπικές διαδικασίες συλλογής και χειρισμού που εφαρμόζονται εντός των εργαστηρίων για τα δείγματα κοπράνων.
2. Τα δείγματα κοπράνων πρέπει να συλλέγονται σε καθαρά, στεγανά δοχεία.
3. ΔΕΝ συνιστάται η φύλαξη των δειγμάτων κοπράνων στο *αραιωτικό*.
4. Μην αφήνετε τα δείγματα κοπράνων στο μείγμα *αραιωτικού/συζεύγματος* για χρονικό διάστημα >24 ωρών.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

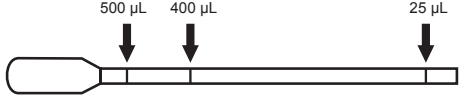
1. Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τον απαιτούμενο αριθμό συσκευών να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Συνιστάται να αφαιρείτε τα αντιδραστήρια από το αφρώδες περίβλημα για να μειώσετε το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη θέρμανσή τους, προκειμένου να φτάσουν στη θερμοκρασία δωματίου.
2. Τοποθετήστε σε όρθια θέση και επισημάνετε με ετικέτα έναν μικρό δοκιμαστικό σωλήνα για κάθε δείγμα και προαιρετικούς εξωτερικούς ορούς ελέγχου, εφόσον χρειάζονται.
3. Χρησιμοποιώντας το μαύρο διαβαθμισμένο σταγονόμετρο, προσθέστε 750 μL (2η διαβάθμιση από το ρύγχος) *αραιωτικού* σε κάθε σωληνάριο για τα δείγματα κοπράνων. **Για δείγματα σε υλικά μεταφοράς, όπως τα Cary Blair ή τα C&S, προσθέστε 650 μL (1η διαβάθμιση από το ρύγχος) *αραιωτικού* στο σωλήνα.**

Τύπος δείγματος	Όγκος *αραιωτικού*
Νωπά δείγματα κοπράνων	750 μL (2η διαβάθμιση από το ρύγχος)
Κατεψυγμένα δείγματα κοπράνων (κατεψυγμένα μη αραιωμένα)	750 μL (2η διαβάθμιση από το ρύγχος)
Δείγματα σε υλικά μεταφοράς (Cary Blair, C&S)	650 μL (1η διαβάθμιση από το ρύγχος)
Εξωτερικοί οροί ελέγχου (θετικός και αρνητικός)	750 μL (2η διαβάθμιση από το ρύγχος)



4. Προσθέστε μία σταγόνα *συζεύγματος* (φιάλη με κόκκινο πώμα) σε κάθε σωλήνα.
5. Χρησιμοποιήστε μία πλαστική πιπέτα μεταφοράς μίας χρήσης (παρέχεται με το κιτ) για κάθε δείγμα – οι πιπέτες φέρουν αυξανόμενες διαβαθμίσεις στα 25 μL, 400 μL και 500 μL.

Διαβαθμισμένη πιπέτα μεταφοράς:



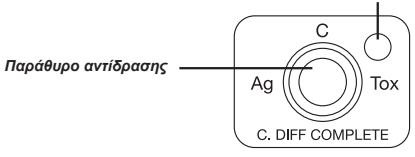
EL

6. **Αναμείξτε διεξοδικά όλα τα δείγματα ανεξάρτητα από τη σύστασή τους - η ομαλή εναιώρηση των δειγμάτων είναι απαραίτητη πριν από τη μεταφορά.**
Υδαρή/Ημιστερεά δείγματα – μεταφέρετε 25 μL δείγματος με μια πιπέτα μεταφοράς και χορηγήστε το στο μείγμα *αραιωτικού/συζεύγματος*. Χρησιμοποιήστε την ίδια πιπέτα μεταφοράς για να αναμείξετε το αραιωμένο δείγμα.
Σχηματισμένα/Στερεά δείγματα – Πρέπει να δοθεί προσοχή στην προσθήκη της σωστής ποσότητας σχηματισμένων κοπράνων στο μείγμα δείγματος. Αναμείξτε διεξοδικά το μείγμα χρησιμοποιώντας ένα ξύλινο ραβδίο εφαρμογής και μεταφέρετε μια μικρή ποσότητα (διαμέτρου 2 mm περίπου που αντιστοιχεί σε 25 μL) του δείγματος στο μείγμα αραιωτικού/συζεύγματος. Γαλακτωματοποιήστε το δείγμα χρησιμοποιώντας το ραβδίο εφαρμογής.
Δείγματα κοπράνων σε υλικό μεταφοράς Cary Blair ή C&S - μεταφέρετε 100 μL (2 σταγόνες από την πιπέτα μεταφοράς) του δείγματος στο μείγμα *αραιωτικού/συζεύγματος*.
7. **Προαιρετικά δείγματα εξωτερικών ορών ελέγχου:**
Εξωτερικός θετικός ορός ελέγχου - προσθέστε μία σταγόνα *θετικού ορού ελέγχου* (φιάλη με γκρι πώμα) στο μείγμα *αραιωτικού/συζεύγματος*.
Εξωτερικός αρνητικός ορός ελέγχου - προσθέστε 25 μL *αραιωτικού* στο μείγμα *αραιωτικού/συζεύγματος*.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η μεταφορά πολύ μικρής ποσότητας δείγματος ή η παράλειψη ανάμειξης και πλήρους εναιώρησης του δείγματος στο μείγμα αραιωτικού/συζεύγματος ενδέχεται να οδηγήσει σε ψευδές αρνητικό αποτέλεσμα της εξέτασης. Η προσθήκη υπερβολικής ποσότητας δείγματος κοπράνων ενδέχεται να οδηγήσει σε μη έγκυρα αποτελέσματα λόγω περιορισμένης ροής του δείγματος.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

1. Χρησιμοποιήστε μία *μεμβρανική συσκευή* ανά δείγμα και μία συσκευή ανά προαιρετικό εξωτερικό θετικό ή αρνητικό ορό ελέγχου, εφόσον χρειάζεται. Πρέπει να αφήνετε τους θύλακες αλουμινίου που περιέχουν τις συσκευές να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου προτού τους ανοίξετε. Χρησιμοποιήστε τη συσκευή άμεσα μετά το άνοιγμα. Επισημάνετε κάθε συσκευή με τη κατάλληλη ετικέτα και τοποθετήστε την σε επίπεδη επιφάνεια έτσι ώστε η επιγραφή «C. DIFF COMPLETE» να βρίσκεται στην κάτω πλευρά της συσκευής και η μικρή κυψελίδα δείγματος να βρίσκεται στην επάνω δεξιά γωνία της συσκευής.

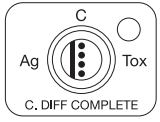


2. Κλείστε κάθε σωλήνα αραιωμένου δείγματος και αναμείξτε διεξοδικά. Μπορείτε να επιτύχετε σωστή ανάμειξη πραγματοποιώντας περιδίνηση ή αναστρέφοντας το σωλήνα. Αφού ένα δείγμα ασθενούς ή ένας *θετικός ορός ελέγχου* αραιωθεί στο μείγμα *αραιωτικού/συζεύγματος*, μπορεί να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα έως και 24 ωρών πριν από την προσθήκη του στη *μεμβρανική συσκευή*.
3. Χρησιμοποιώντας μια νέα πιπέτα μεταφοράς μεταφέρετε 500 μL αραιωμένου μείγματος δείγματος-συζεύγματος στην ***κυψελίδα δείγματος*** (τη μικρότερη οπή στην επάνω δεξιά γωνία της συσκευής) μιας *μεμβρανικής συσκευής* εξασφαλίζοντας ότι το υγρό δείγμα αποστραγγίζεται στο τμήμα απορρόφησης που βρίσκεται στο εσωτερικό της *μεμβρανικής συσκευής*. Κατά τη φόρτωση του δείγματος στην κυψελίδα δείγματος, εξασφαλίστε ότι το ρύγχος της πιπέτας μεταφοράς κλίνει προς το *παράθυρο αντίδρασης* (τη μεγαλύτερη οπή στο μέσο της συσκευής).
4. Επωάστε τη συσκευή σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά – το δείγμα θα απορροφηθεί από τη συσκευή και θα εμφανιστεί μια υγρή περιοχή κατά πλάτος του *παραθύρου αντίδρασης*.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΜΕΤΑΚΙΝΟΥΝΤΑΙ:
Σε μερικές περιπτώσεις, ένα αραιωμένο δείγμα δεν μετακινείται σωστά και το παράθυρο αντίδρασης δεν είναι υγρό σε όλη την έκτασή του. Αν το παράθυρο αντίδρασης δεν φαίνεται εντελώς υγρό σε διάστημα 5 λεπτών από την προσθήκη του δείγματος στην κυψελίδα δείγματος, τότε προσθέστε 100 μL (4 σταγόνες) αραιωτικού στην κυψελίδα δείγματος και περιμένετε ακόμα 5 λεπτά (συνολικά 20 λεπτά).
5. Μετά από την επώαση προσθέστε 300 μL *ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης* στο ***παράθυρο αντίδρασης*** χρησιμοποιώντας το λευκό διαβαθμισμένο σταγονόμετρο. Αφήστε το *ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης* να διέλθει μέσα από τη μεμβράνη του παραθύρου αντίδρασης και να απορροφηθεί πλήρως.
6. Προσθέστε 2 σταγόνες *υποστρώματος* (φιάλη με λευκό πώμα) στο ***παράθυρο αντίδρασης***. Μετά από 10 λεπτά ελέγξτε και καταγράψτε τα αποτελέσματα οπτικά.

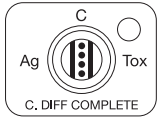
ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Η ερμηνεία της εξέτασης είναι πιο αξιόπιστη όταν ελέγχετε τη συσκευή αμέσως μετά το πέρας της περιόδου αντίδρασης 10 λεπτών. Ελέγξτε τα αποτελέσματα στη συσκευή από κανονική απόσταση εργασίας σε επαρκώς φωτισμένο χώρο. Κοιτάξτε σε ευθεία γραμμή ακριβώς πάνω από τη συσκευή.
2. Ελέγξτε τη συσκευή για την παρουσία των μπλε κουκίδων στο μέσο του *παραθύρου αντίδρασης* που αντιπροσωπεύουν το εσωτερικό θετικό ορό ελέγχου. Η εμφάνιση κουκκίδων ελέγχου υποδεικνύει ότι ο εσωτερικός έλεγχος είναι έγκυρος. Το φόντο ενδέχεται να εμφανίζεται από λευκό έως γαλάζιο. Ελέγξτε τη συσκευή για την παρουσία των μπλε γραμμών στις πλευρές «Ag» και «Tox» του *παραθύρου αντίδρασης* που αντιπροσωπεύουν τις γραμμές εξέτασης. Οι γραμμές ενδέχεται να εμφανίζονται αχνές έως έντονες ως προς την ένταση.
3. **Θετικό αποτέλεσμα για αντιγόνο («Ag»):** Ένα θετικό αποτέλεσμα για αντιγόνο μπορεί να ερμηνευθεί οποιαδήποτε στιγμή μεταξύ της προσθήκης *υποστρώματος* και του 10λεπτου χρονικού διαστήματος ανάγνωσης. Για να είναι ένα αποτέλεσμα για αντιγόνο θετικό, η μπλε γραμμή «Ag» και η διάστικτη μπλε γραμμή ελέγχου κάτω από την ένδειξη «C» πρέπει να είναι ορατές (Εικόνα 1α). Οι γραμμές ενδέχεται να εμφανίζονται αχνές έως έντονες ως προς την ένταση. Μια εμφανής μερική γραμμή ερμηνεύεται ως θετικό αποτέλεσμα. Μην ερμηνεύετε τον αποχρωματισμό της μεμβράνης ως θετικό αποτέλεσμα. Το θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύει την παρουσία του *C. difficile*.
4. **Θετικό αποτέλεσμα για αντιγόνο και τοξίνες («Tox»):** Αν το αποτέλεσμα για αντιγόνο είναι θετικό (δηλαδή εμφανίζεται μια μπλε γραμμή «Ag» και μια διάστικτη μπλε γραμμή ελέγχου κάτω από την ένδειξη «C»), προχωρήστε στην ερμηνεία του αποτελέσματος για τις τοξίνες. Ένα θετικό αποτέλεσμα για τις τοξίνες μπορεί να ερμηνευθεί οποιαδήποτε στιγμή μεταξύ της προσθήκης *υποστρώματος* και του 10λεπτου χρονικού διαστήματος ανάγνωσης. Για να είναι ένα αποτέλεσμα για τοξίνες θετικό, η μπλε γραμμή «Tox» πρέπει να είναι ορατή (Εικόνα 1β). Η γραμμή ενδέχεται να εμφανίζεται αχνή έως έντονη ως προς την ένταση. Μια εμφανής μερική γραμμή ερμηνεύεται ως θετικό αποτέλεσμα. Μην ερμηνεύετε τον αποχρωματισμό της μεμβράνης ως θετικό αποτέλεσμα. Το θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύει την παρουσία της τοξίνης *C. difficile*.
5. **Αρνητικό αποτέλεσμα:** Μια εξέταση δεν μπορεί να ερμηνεύεται ως αρνητική ή άκυρη προτού παρέλθουν 10 λεπτά από την προσθήκη του *υποστρώματος*. Μία μπλε διάστικτη γραμμή εμφανίζεται στο μέσο του *παραθύρου αντίδρασης*, κάτω από την ένδειξη «C» και δεν εμφανίζεται καμία γραμμή εξέτασης στην πλευρά «Ag» ή στην πλευρά «Tox» του *παραθύρου αντίδρασης*, (Εικόνα 1γ). Το αρνητικό αποτέλεσμα στο τμήμα εξέτασης αντιγόνου υποδεικνύει ότι το αντιγόνο του *C. difficile* είτε απουσιάζει από το δείγμα είτε βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης της εξέτασης. Το αρνητικό αποτέλεσμα στο τμήμα εξέτασης τοξινών υποδεικνύει ότι η τοξίνη C. difficile είτε απουσιάζει από το δείγμα είτε βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης της εξέτασης.
6. **Μη έγκυρο αποτέλεσμα:** Καμία γραμμή δεν εμφανίζεται στο παράθυρο αντίδρασης (Εικόνα 1δ). Το αποτέλεσμα της εξέτασης δεν είναι έγκυρο αν δεν εμφανίζεται μια μπλε διάστικτη γραμμή κάτω από την ένδειξη «C» αφού παρέλθει η περίοδος αντίδρασης (Εικόνες 1ε, 1στ, 1ζ).
7. **Αρνητικό αποτέλεσμα για αντιγόνο («Ag»), θετικό αποτέλεσμα για τοξίνες («Tox»):** Ένα μικρό ποσοστό δειγμάτων ενδέχεται να βρεθούν αρνητικά στο αντιγόνο αλλά θετικά στις τοξίνες. Αυτά τα δείγματα πρέπει να θεωρηθούν ασαφή και οι ασθενείς πρέπει να εξεταστούν ξανά με χρήση νέου δείγματος (Εικόνα 1η). Αν η επανεξέταση του δείγματος αποφέρει αρνητικό αποτέλεσμα για το αντιγόνο αλλά θετικό για τις τοξίνες, καταγράψτε το ως θετικό αποτέλεσμα για τις τοξίνες.

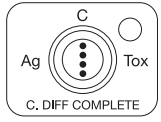
ΕΙΚΟΝΑ 1: ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®



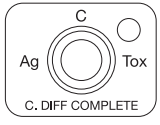
Εικόνα 1α
Θετικό αποτέλεσμα για αντιγόνο



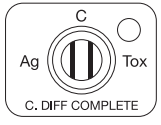
Εικόνα 1β
Θετικό αποτέλεσμα για αντιγόνο και τοξίνες



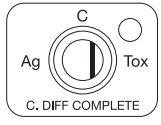
Εικόνα 1γ
Αρνητικό αποτέλεσμα



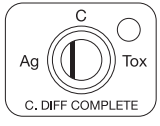
Εικόνα 1δ
Μη έγκυρο αποτέλεσμα



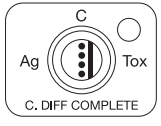
Εικόνα 1ε
Μη έγκυρο αποτέλεσμα



Εικόνα 1στ
Μη έγκυρο αποτέλεσμα



Εικόνα 1ζ
Μη έγκυρο αποτέλεσμα



Εικόνα 1η
Ανατρέξτε στην παράγραφο 7 για ερμηνεία

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Εσωτερικός: Μία μπλε διάστικτη γραμμή πρέπει να είναι ορατή στο μέσο του *παραθύρου αντίδρασης*, κάτω από την ένδειξη «C» σε κάθε *μεμβρανική συσκευή* που εξετάζεται. Η εμφάνιση των μπλε κουκίδων ελέγχου επιβεβαιώνει ότι το δείγμα και τα αντιδραστήρια προστέθηκαν σωστά, ότι τα αντιδραστήρια ήταν δραστικά κατά το χρόνο εκτέλεσης της ανάλυσης και ότι το δείγμα μετακινήθηκε σωστά μέσω της *μεμβρανικής συσκευής*. Επίσης, επιβεβαιώνει την αντιδραστικότητα των άλλων αντιδραστηρίων που σχετίζονται με την ανάλυση. Το διαυγές φόντο στην περιοχή αποτελεσμάτων θεωρείται ως εσωτερικός αρνητικός έλεγχος. Αν η εξέταση έχει εκτελεστεί σωστά και τα αντιδραστήρια λειτουργούν σωστά, το φόντο θα είναι λευκό για να αποδώσει ένα διακριτό αποτέλεσμα.

Εξωτερικός: Η αντιδραστικότητα του κιτ *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® πρέπει να επαληθεύεται κατά την παραλαβή με χρήση του *θετικού ορού ελέγχου* και του αρνητικού ορού ελέγχου (*αραιωτικό*). Ο *θετικός ορός ελέγχου* παρέχεται με το κιτ (φιάλη με γκρι πώμα). Ο *θετικός ορός ελέγχου* επιβεβαιώνει την αντιδραστικότητα των άλλων αντιδραστηρίων που σχετίζονται με την ανάλυση και δεν προορίζεται για τη διασφάλιση της ακρίβειας των οριακών τιμών της ανάλυσης. Το *αραιωτικό* χρησιμοποιείται για τον αρνητικό έλεγχο. Μπορούν να εκτελεστούν πρόσθετες εξετάσεις με τους ορούς ελέγχους, προκειμένου να επιτευχθεί συμμόρφωση με τις απαιτήσεις των τοπικών, περιφερειακών ή/και κρατικών κανονισμών ή/και των οργανισμών πιστοποίησης.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Η εξέταση *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του αντιγόνου και των τοξινών του C. difficile σε δείγματα κοπράνων. Η εξέταση επιβεβαιώνει την παρουσία τοξινών στα κόπρανα και αυτές οι πληροφορίες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη από τον ιατρό σε συνδυασμό με το ιατρικό ιστορικό και τη φυσική εξέταση του ασθενούς. Η εξέταση *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® ανιχνεύει τα επίπεδα της τοξίνης A σε συγκέντρωση ≥0,63 ng/mL, της τοξίνης B σε συγκέντρωση ≥0,16 ng/mL και της γλουταμικής δεσυδρογονάσης σε συγκέντρωση ≥0,8 ng/mL.
2. Τα δείγματα κοπράνων είναι εξαιρετικά πολύπλοκα. Τα βέλτιστα αποτελέσματα με την εξέταση *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® λαμβάνονται με δείγματα που έχουν συλλεχθεί πριν από χρονικό διάστημα μικρότερο των 24 ωρών. Τα περισσότερα μη αραιωμένα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν σε θερμοκρασία μεταξύ 2°C και 8°C για 72 ώρες, χρονικό διάστημα μετά το οποίο ενδέχεται να παρατηρηθεί σημαντική αλλοίωση των τοξινών. Αν τα δείγματα δεν αναλυθούν εντός αυτού του χρονικού διαστήματος, μπορούν να καταψυχθούν και να αποψυχθούν. Ωστόσο, η επανειλημμένη ψύξη και απόψυξη ενδέχεται να οδηγήσει σε απώλεια της ανοσοαντιδραστικότητας του αντιγόνου και των τοξινών A και B.
3. Ορισμένα δείγματα ενδέχεται να έχουν μικρές αντιδράσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως την παρουσία χαμηλών επιπέδων αντιγόνου ή/και τοξίνης, την παρουσία δεσμευτικών ουσιών ή ενζύμων αδρανοποίησης στα κόπρανα. Οι γραμμές ενδέχεται να εμφανίζονται αχνές έως έντονες ως προς την ένταση. Αυτά τα δείγματα πρέπει να αναφέρονται ως θετικά αν παρατηρείται μια μπλε γραμμή, ακόμα κι αν είναι μερική. Μια εμφανής μερική μπλε γραμμή ερμηνεύεται ως θετικό αποτέλεσμα
4. Δείγματα κοπράνων διατηρημένα σε συγκέντρωση 10% φορμαλίνης, φορμαλίνη merthiolate, φορμαλίνη με οξικό νάτριο ή πολυβινυλο-αλκοόλη δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν.
5. Η εξέταση *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® είναι ποιοτική. Η ένταση του χρώματος δεν θα πρέπει να ερμηνεύεται ποσοτικά.
6. Ορισμένα μεμονωμένα στελέχη *C. sordellii* ενδέχεται να αντιδράσουν στην εξέταση *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®, εξαιτίας της παραγωγής τοξινών που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό (1).
7. Ποσοστά αποικισμού έως και 50% έχουν αναφερθεί σε βρέφη. Επίσης, έχει αναφερθεί υψηλό ποσοστό σε ασθενείς με κυστική ίνωση (1,3). Τα αποτελέσματα ενδέχεται να εμφανίζονται ως θετικά σε αυτές τις ομάδες, αλλά θα πρέπει να εξετάζονται σε συνδυασμό με την πιθανότητα να πρόκειται για αποικισμένους φορείς.
8. Ο μόνος μη *C. difficile* οργανισμός που αντέδρασε στο τμήμα των τοξινών της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® ήταν ο *Clostridium sordellii* VPI 9048. Αυτό το στέλεχος παράγει τοξίνες HT και LT, οι οποίες είναι ομόλογες των τοξινών A και B, αντίστοιχα.
9. Δεν υπάρχουν δεδομένα για την επίδραση που έχουν οι πλύσεις του κόλου, ο βαριούχος υποκλυσμός, τα καθαρτικά ή η προετοιμασία του παχέος εντέρου στην απόδοση της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®. Όλες αυτές οι διαδικασίες μπορούν να οδηγήσουν στην εκτεταμένη αραίωση ή την παρουσία πρόσθετων ουσιών που ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της εξέτασης.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Η νόσος *Clostridium difficile* είναι κατ' αρχάς μια νοσοκομειακή νόσος που προσβάλλει ηλικιωμένους ασθενείς και η συχνότητα της νόσου εξαρτάται από παράγοντες, όπως τον πληθυσμό των ασθενών, τον τύπο του ιδρύματος και την επιδημιολογία. Η αναφερθείσα συχνότητα της νόσου *C. difficile* σε ασθενείς με διάρροια που σχετίζεται με αντιβιοτικά ενδέχεται να κυμαίνεται μεταξύ του 5 και του 20% και τα νοσοκομεία μπορεί να αντιμετωπίσουν περιστατικά σε ποσοστά μεγαλύτερα ή μικρότερα αυτού του εύρους. Είναι σημαντικό τα αποτελέσματα των εξετάσεων να ληφθούν υπόψη σε συνδυασμό με τα κλινικά συμπτώματα, επειδή ορισμένοι υγιείς ενήλικες και ένας μεγάλος αριθμός υγειών βρεφών (έως 50%) θα είναι θετικοί στην τοξίνη *C. difficile*. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ένα ποσοστό 22% έως 32% φορέων της τοξίνης *C. difficile* σε ασθενείς με κυστική ίνωση (1,3). Στις μελέτες που διεξήχθησαν για την παρούσα συσκευή, με χρήση συμπτωματικών ασθενών, η συχνότητα των τοξινών A και B ήταν 12% και της τοξίνης GDH ήταν 18%. Ένα θετικό αποτέλεσμα στο τμήμα του αντιγόνου της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® επιβεβαιώνει την παρουσία του οργανισμού *C. difficile* στο δείγμα των κοπράνων, ενώ ένα

αρνητικό αποτέλεσμα είναι ενδεικτικό της απουσίας του οργανισμού. Ένα θετικό αποτέλεσμα στο τμήμα των τοξινών της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® επιβεβαιώνει την παρουσία της τοξίνης *C. difficile* στο δείγμα των κοπράνων, ενώ ένα αρνητικό αποτέλεσμα είναι ενδεικτικό της απουσίας της τοξίνης ή υποδεικνύει ανεπαρκή επίπεδα τοξίνης για την ανίχνευση.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Κλινική αξιολόγηση του τμήματος του αντιγόνου της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®
Έγινε σύγκριση του τμήματος του αντιγόνου της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® με την καλλιέργεια βακτηρίων. Τα δείγματα που συμπεριλήφθηκαν στην αξιολόγηση υποβλήθηκαν στα κλινικά εργαστήρια για εξέταση ρουτίνας. Η εξέταση καλλιέργειας βακτηρίων διεξήχθη σύμφωνα με τις διαδικασίες των εργαστηρίων. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Σύνοψη κλινικής απόδοσης στη σύγκριση της εξέτασης C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® με την καλλιέργεια βακτηρίων

n = 1126	Καλλιέργεια βακτηρίων Θετική	Καλλιέργεια βακτηρίων Αρνητική
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Θετική γραμμή αντιγόνου	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Αρνητική γραμμή αντιγόνου	21	842

		95% όρια εμπιστοσύνης
Ευαισθησία	90,5%	85,7 – 93,9
Ειδικότητα	93,1%	91,2 – 94,7
Θετική τιμή πρόβλεψης	76,4%	70,7 – 81,3
Αρνητική τιμή πρόβλεψης	97,6%	96,2 – 98,4
Συσχετισμός	92,6%	91,8 – 93,4

Τα ασύμφωνα δείγματα αξιολογήθηκαν με χρήση τρεχουσών εξετάσεων ELISA για γλουταμική δεσυδρογονάση *C. difficile*.
Είκοσι εννέα από τα 62 ψευδή θετικά δείγματα ήταν θετικά με άλλη εξέταση GDH και θεωρήθηκαν αληθή θετικά.
Δεκατρία από τα 21 ψευδή αρνητικά δείγματα ήταν αρνητικά με άλλη εξέταση GDH και θεωρήθηκαν αληθή αρνητικά.

Έγινε σύγκριση του τμήματος του αντιγόνου της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® με την ιστοκαλλιέργεια για την ανίχνευση της τοξίνης C. difficile. Τα δείγματα που συμπεριλήφθηκαν στην αξιολόγηση υποβλήθηκαν στα κλινικά εργαστήρια για εξέταση ρουτίνας. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 2. Το τμήμα του αντιγόνου της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® ανίχνευσε το 98,7% των δειγμάτων που ήταν θετικά στην ιστοκαλλιέργεια.

Πίνακας 2. Σύνοψη κλινικής απόδοσης στη σύγκριση της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® με την ιστοκαλλιέργεια

n = 1126	Ιστοκαλλιέργεια Θετική	Ιστοκαλλιέργεια Αρνητική
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Θετική γραμμή αντιγόνου	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Αρνητική γραμμή αντιγόνου	2	861

Κλινική αξιολόγηση του τμήματος των τοξινών της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®
Έγινε σύγκριση του τμήματος των τοξινών της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® με την ιστοκαλλιέργεια σε δύο κλινικά εργαστήρια και εσωτερικά στην TECHLAB®, Inc. Τα δείγματα που συμπεριλήφθηκαν στην αξιολόγηση υποβλήθηκαν στα κλινικά εργαστήρια για εξέταση ρουτίνας. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Σύνοψη κλινικής απόδοσης στη σύγκριση της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® με την ιστοκαλλιέργεια

n = 1126	Ιστοκαλλιέργεια Θετική	Ιστοκαλλιέργεια Αρνητική
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Θετική γραμμή τοξινών	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Αρνητική γραμμή τοξινών	19	964

		95% όρια εμπιστοσύνης
Ευαισθησία	87,8%	81,4 - 92,3
Ειδικότητα	99,4%	98,6 - 99,7
Θετική τιμή πρόβλεψης	95,8%	90,7 - 98,3
Αρνητική τιμή πρόβλεψης	98,1%	96,9 - 98,8
Συσχετισμός	97,8%	97,6 - 98,0

Τα ασύμφωνα δείγματα αξιολογήθηκαν με χρήση τρεχουσών εξετάσεων ELISA για τις τοξίνες A και B.
Πέντε από τα 6 ψευδή θετικά δείγματα ήταν θετικά με εξέταση ELISA και θεωρήθηκαν αληθή θετικά.
Δώδεκα από τα 19 ψευδή αρνητικά δείγματα ήταν αρνητικά με εξέταση ELISA και θεωρήθηκαν αληθή αρνητικά.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΟΠΡΑΝΩΝ

Επίδραση σύστασης δείγματος κοπράνων στην εξέταση *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Η αντίδραση των δειγμάτων κοπράνων διαφόρων συστάσεων στο τμήμα του αντιγόνου (n=978) και το τμήμα των τοξινών (n=981) της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® παρατίθεται στους Πίνακες 4 και 5. Τα ποσοστά των θετικών αντιδράσεων είτε μέσω ανάλυσης καλλιέργειας είτε μέσω της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® ήταν παρόμοια και στους τρεις τύπους των δειγμάτων κοπράνων (υδαρή, ημιστερεά και στερεά). Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε εξέταση για C. difficile. Η βάση της υποβολής προς εξέταση ήταν το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς και όχι η σύσταση του δείγματος. Στο τμήμα του αντιγόνου, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η εξέταση *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® διεξήχθη παρόμοια με την καλλιέργεια βακτηρίων κατά την εξέταση δειγμάτων διαφορετικής σύστασης. Στο τμήμα των τοξινών, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η εξέταση *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® διεξήχθη παρόμοια με την ιστοκαλλιέργεια κατά την εξέταση δειγμάτων διαφορετικής σύστασης.

Πίνακας 4. Αντίδραση δειγμάτων κοπράνων διαφορετικής σύστασης στο τμήμα του αντιγόνου της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Αριθμός δειγμάτων (n = 978)	Υδαρή δείγματα (n = 335)	Ημιστερεά δείγματα (n = 522)	Στερεά δείγματα (n = 121)
Θετική με καλλιέργεια βακτηρίων	59 (17,6%)	110 (21,1%)	19 (15,7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Θετική γραμμή αντιγόνου	72 (21,5%)	128 (24,5%)	25 (20,7%)
Αρνητική με καλλιέργεια βακτηρίων	276 (82,4%)	412 (78,9%)	102 (84,3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Αρνητική γραμμή αντιγόνου	263 (78,5%)	394 (75,5%)	96 (79,3%)

Πίνακας 5. Αντίδραση δειγμάτων κοπράνων διαφορετικής σύστασης στο τμήμα των τοξινών της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Αριθμός δειγμάτων (n = 981)	Υδαρή δείγματα (n = 336)	Ημιστερεά δείγματα (n = 523)	Στερεά δείγματα (n = 122)
Θετική με ιστοκαλλιέργεια	43 (12,8%)	81 (15,5%)	8 (6,6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Θετική γραμμή τοξινών	42 (12,5%)	72 (13,8%)	7 (5,7%)
Αρνητική με ιστοκαλλιέργεια	293 (87,2%)	442 (84,5%)	114 (93,4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Αρνητική γραμμή τοξινών	294 (87,5%)	451 (86,2%)	115 (94,3%)

ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η οριακή τιμή για την ανάλυση καθορίστηκε σε συγκεντρώσεις 0,63 ng/mL για την τοξίνη A, 0,16 ng/mL για την τοξίνη B και 0,8 ng/mL για τη γλουταμική δεσυδρογονάση.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

Η αναπαραγωγιμότητα της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® προσδιορίστηκε με χρήση 12 δειγμάτων κοπράνων, τα οποία κωδικοποιήθηκαν ώστε να μην είναι δυνατή η αναγνώρισή τους κατά την εξέταση. Η εξέταση διεξήχθη από 3 ανεξάρτητα εργαστήρια, τα οποία εξέτασαν τα δείγματα για 3 ημέρες. Τα δείγματα απέδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα στο 100% των εξετάσεων.

ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Δείγματα κοπράνων ενοφθαλισμένα με τους ακόλουθους μικροοργανισμούς σε τελική συγκέντρωση περίπου 10^8 ή περισσότερων οργανισμών ανά mL δεν αντέδρασαν στο τμήμα του αντιγόνου ή των τοξινών της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®:

Βακτήριο ή Παθογόνο: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (nontoxigenic), *Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans), *Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

Ο μόνος μη *C. difficile* οργανισμός που αντέδρασε στο τμήμα των τοξινών της εξέτασης *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® ήταν ο *Clostridium sordellii* VPI 9048. Αυτό το στέλεχος παράγει τοξίνες HT και LT, οι οποίες είναι ομόλογες των τοξινών A και B, αντίστοιχα.

Οι ακόλουθοι ιοί $10^{3.3}$ έως $10^{8.25}$ μονάδων TCID ανά 0,2 mL δεν αντέδρασαν στην εξέταση *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®:

Ιοί: Αδενοϊός τύπου 1, 2, 3, 5, 40, 41, Ανθρώπινος κορονοϊός, Ιός Κοξάκι B2, B3, B4, B5, Ιός Echo 9, 11, 18, 22, 33, Εντεροϊός τύπου 68, 69, 70, 71, Ροταϊός.

ΠΑΡΕΜΒΑΛΛΟΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Η παρουσία των παρακάτω ουσιών (τυποποίηση Η.Π.Α.) στα κόπρανα στην αναφερόμενη συγκέντρωση δεν είχε καμία επίδραση στα αποτελέσματα της εξέτασης: βλεννίνη (3,5% w/v), ανθρώπινο αίμα (40% v/v), θειικό βάριο (5% w/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), στερικό/παλμιτικό οξύ (40% w/v), μετροδιναζόλη (0,25% w/v), βανκομυκίνη (0,25% w/v).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΥ ΛΗΦΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΑΓΑΡ ΚΥΚΛΟΣΕΡΙΝΗΣ-ΚΕΦΟΞΙΤΙΝΗΣ-ΦΡΟΥΚΤΟΖΗΣ (CCFA)

Συνολικά 103 κλινικά απομονωμένα στελέχη *C. difficile*, τα οποία λήφθηκαν μέσω αναερόβιας καλλιέργειας βακτηρίων από CCFA μετά από 3 ημέρες στους 37°C, υποβλήθηκαν σε δοκιμασία στην εξέταση *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®. Για την ανάλυση, μεμονωμένες αποικίες συλλέχθηκαν και εναιωρήθηκαν σε *ορατό*, όπως συνιστάται για δείγματα κοπράνων. Και τα 103 μεμονωμένα στελέχη είχαν θετική αντίδραση στο αντιγόνο στην εξέταση.

Εβδομήντα από τα 103 μεμονωμένα στελέχη (68%) προήλθαν από δείγματα κοπράνων που αντέδρασαν θετικά στην τοξίνη *C. difficile* με ιστοκαλλιέργεια. Από αυτά, 56 (80%) είχαν θετική αντίδραση στην τοξίνη κατά τον έλεγχο μετά από αναερόβια ανάπτυξη σε CCFA για 3 ημέρες στους 37°C.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

RENDELTETÉSSZERŰ HASZNÁLAT

A TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* teszt gyors membrán enzim immunoassay a *Clostridium difficile* glutamát-dehidrogenáz antigén, valamint az A és B toxinok egyidejű kimutatására egyetlen reakciówellben. A teszt érzékeli a *C. difficile* antigént, és a glutamát-dehidrogenázt, amely szűrőként használatos a *C. difficile* jelenlétére vonatkozóan és megerősíti a toxigén *C. difficile* jelenlétét azáltal, hogy észleli az A és B toxinokat olyan személyek székletmintájában, akiknél a *C. difficile* betegség gyanúja fennáll. A teszt arra használandó, hogy segítse a *C. difficile* betegség diagnózisát. Mint az egyéb *C. difficile* tesztek esetén, az eredményeket a páciens kórtörténetével együtt kell figyelembe venni.

MAGYARÁZAT

Antibiotikumos kezelés után számos páciensnél gyomor-bélrendszeri problémák lépnek fel, amelyek enyhe hasmenéstől pszeudomembranózus kolitiszig terjednek. A gyomor-bélrendszeri betegség enyhébb formáinak számos eseteit és a pszeudomembranózus colitis legtöbb esetét a *Clostridium difficile* toxigén törzsei okozzák (1). Ez az organizmus opportunista anaerob baktériuma, amely a bélben nő, amint a normál flórát az antibiotikum megváltoztatta. A *C. difficile* toxigén törzsei hordozzák a toxinokat kódoló géneket, míg a nem toxigén törzsek nem hordozzák a toxin géneket. A betegség kialakulása olyan toxinokkal kapcsolatos, amelyeket a toxigén organizmus termel. A betegséggel kapcsolatos klinikai tünetek vélhetően elsősorban az A toxin következtében alakulnak ki, amely egy szövet-károsító enterotoxin (2,3). A *C. difficile* egy másik toxint is termel, amelynek a neve B toxin. A B toxin, amelyre korábban, mint az organizmus citotoxinjára hivatkoztak, számos laboratórium által jelenleg használt szövetkultúra assay által érzékelt toxin. A toxigén *C. difficile* törzsek mindkét toxint vagy csak a B toxint termelik (4-7). A *C. difficile* jó antigén marker a székletben lévő organizmusra vonatkozóan, mivel nagy mennyiségben termeli minden törzs, a toxigén és nem toxigén egyaránt (8-10). Az antigén kimutatható székletmintákban a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* teszt használatával. A *C. difficile* glutamát-dehidrogenázára vonatkozó teszt pozitív eredménye megerősíti a szóban forgó organizmus jelenlétét a székletmintában, a negatív eredmény az organizmus hiányát jelzi. Az A és B toxinokra vonatkozó teszt pozitív eredménye megerősíti a toxigén *C. difficile* jelenlétét.

A TESZT ELVE

A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* olyan antitesteket használ, amelyek specifikusak a glutamát-dehidrogenázra és a *C. difficile* A és B toxinjaira vonatkozóan. Az eszköz az immobilizált antitestek három függőleges vonalával rendelkező reakcióablakot tartalmaz. Az antigén tesztvonal (“Ag”) a *C. difficile* glutamát-dehidrogenáz elleni antitesteket tartalmaz. A kontrollvonal ("C") szaggatott vonal, amely anti-torma-peroxidáz (HRP) antitesteket tartalmaz. Az A és B toxinok tesztvonala ("Tox") a *C. difficile* A és B toxinok elleni antitesteket tartalmaz. A *Konjugátum* a glutamát-dehidrogenázra és az A és B toxinokra vonatkozó antitesteket tartalmazza, amelyek a torma peroxidázhoz kapcsolódnak. A teszt elvégzéséhez a mintát egy olyan csőhöz adják, amely a *Hígító* és a *Konjugátum* keverékét tartalmazza. A hígított minta-konjugátum keveréket hozzáadják a *Minta Wellhez* és az eszközt hagyják inkubálni 15 percig szobahőmérsékleten. Az inkubálás alatt a mintában jelenlévő bármely glutamát-dehidrogenáz, valamint az A és B toxinok az antitest-peroxidáz konjugátumokhoz kötődnek. Az antigén-antitest konjugátum komplexek szűrőbetéten keresztül vándorolnak egy membránhoz, ahol a vonalakban lévő immobilizált glutamát-dehidrogenáz-specifikus, valamint az A- és B-toxin-specifikus antitestek megkötik őket. A *Reakcióablakot* ezután kimossák a *Mosópufferrel*, amelyet a *Szubsztrát* hozzáadása követ. 10 perces inkubációs idő után az "Ag" reakciót szemrevételezéssel megvizsgálják, hogy megjelenik-e egy függőleges kék vonal a *Reakcióablak* "Ag" oldalán. A kék vonal pozitív tesztet jelent. Ha az "Ag" pozitív, a "Tox" reakciót szemrevételezéssel ellenőrizni kell, hogy nincs-e jelen kék vonal a *Reakcióablak* "Tox" oldalán. A kék vonal pozitív tesztet jelent. A pozitív "C" reakciók, amelyet a *Reakcióablak* "C" része alatti függőleges szaggatott kék vonal jelez, megerősíti, hogy a teszt megfelelően működik és az eredmények érvényesek.

BIZTOSÍTOTT ANYAGOK

MEM | DEV — ***Membráneszközök*** – mindegyik tasak 1 eszközt tartalmaz

DIL | SPE — ***Hígító* (22 ml üvegenként)** – Pufferelt fehérjeoldat fokbeosztásos cseppentő szerelvénnyel (0,05% ProClin® 300-at tartalmaz)*

WASH | REAG — ***Mosópuffer* (12 ml üvegenként)** – Pufferelt oldat fokbeosztásos cseppentő szerelvénnyel (0,05% ProClin® 300-at tartalmaz)*

SUBS | REAG — ***Subsztrát* (3,5 ml üvegenként)** – Tetrametilbenzidint tartalmazó oldat

CONJ | ENZ — ***Konjugátum* (2,5 ml üvegenként)** – Egér monoklonális antitest, amely specifikus a glutamát-dehidrogenázra vonatkozóan tormaperoxidázhoz kapcsolva, és kecske poliklonális antitestek, amelyek specifikusak az A és B toxinokra vonatkozóan, tormaperoxidázhoz kapcsolva, pufferelt fehérjeoldatban (0,05% ProClin® 300-at tartalmaz)*

CONTROL | + — ***Pozitív kontroll* (2 ml)** – Antigén pufferelt fehérjeoldatban

Eldobható műanyag transzferpipetták – 25 µl, 400 µl és 500 µl fokbeosztással ellátva.

IVD — *In vitro* diagnosztikai használatra

*Figyelmeztetés: Figyelem
H317: Allergiás bőrreakciót okozhat
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

SZÜKSÉGES, DE NEM MELLÉKELT ESZKÖZÖK

Kis tesztcsövek (pl., műanyag Eppendorf csövek vagy üvegcsövek)
Applikátor pálcák *Időzítő* *Vortex keverő*
Eldobható kesztyűk székletminták kezelésére *Pipetta és hegyek*

POLCÉLETTARTAM ÉS TÁROLÁS

A készlet lejárati ideje a címkén szerepel. Mindegyik komponensre vonatkozó lejárati dátumok az egyes címkéken szerepelnek. A készlet 2°C és 8°C között tárolandó.

ÓVINTÉZKEDÉSEK

1. A különböző készletekből származó reagenseket nem szabad összekeverni vagy felcserélni. Ne használja a készletet a lejárati dátumon túl.
2. A készlet minden összetevőjét meg kell vizsgálni, hogy nem láthatók-e rajta szivárgás jelei. Megérkezéskor vizsgálja meg a készletet annak biztosítása érdekében, hogy a komponensek ne legyenek fagyottak vagy meleg tapintásúak a nem megfelelő szállítási körülmények miatt.
3. Minden komponenst hozzon SZOBAHŐMÉRSÉKLETRE HASZNÁLAT ELŐTT!
4. A kupakok, hegyek és csepegtető szerelvények színkódoltak; NE keverje, és ne cserélje ki őket!
5. Ne fagyassza le a reagenseket. A készlet 2°C és 8°C között tárolandó.
6. A *Membráneszközt* tartalmazó tasaknak szobahőmérsékletűnek kell lennie felnyitás előtt. A membráneszközöket tartsa szárazon használat előtt.

7. A székletmintákat mintavétel után 72 órán belül használja fel az optimális eredmények érdekében. A fagyasztott minták elveszthetik az aktivitásukat a fagyasztás és felolvasztás miatt. Fagyasztott minták használatakor olvassza fel őket szobahőmérsékleten.
8. Tartsa a reagensüvegeket függőlegesen a reagensek adagolására, hogy biztosítsa az egységes cseppméretet és a megfelelő térfogatot.
9. A mintákat és a membráneszközöket potenciális biológiai veszélyforrásként kell kezelni és ártalmatlanítani használat után.
10. A membráneszközök nem használhatók újra.
11. A tesztet optimalizálták érzékenységre és specificitásra vonatkozóan. A megadott eljárás és/vagy tesztfeltételek módosításai befolyásolhatják a teszt érzékenységét és specificitását. Ne térjen el a megadott eljárástól.
12. Figyeljen az assay teljes idejére egynél több székletminta tesztelésekor. Először adja hozzá a *Hígítót*, majd adja a *Konjugátumot* minden, *Hígítót* tartalmazó csőhöz. Majd adja a mintát a *Hígítót*/*Konjugátumot* tartalmazó csőhöz. Alaposan keverje össze az összes hígított mintát és vigye át a *Membráneszközbe*. A 15 perces inkubációs lépés azután kezdődik, hogy az utolsó hígított minta-konjugátum keveréket átvitték a végső *Membráneszközbe*.
13. Ha a *Szubsztrát* reagens sötétkék/lila színre változik, a cseréhez hívja a műszaki szolgálatot.
14. A székletminták potenciálisan fertőző ágenseket tartalmazhatnak és a 2. biológiai biztonsági szintnek ("Biosafety Level 2") megfelelően kezelendők a CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Biológiai biztonság a mikrobiológiai és biomedikai laboratóriumokban)" című kézikönyvében szereplő ajánlás szerint.
15. Az összes reagens csak *in vitro* diagnosztikai célra használható.
16. A teszt végzésekor viseljen eldobható kesztyűt.
17. A reagens tartósítószerként 0,05% ProClin® 300-at tartalmaz. Habár a koncentráció alacsony, a ProClin® 300 káros hatású. Amennyiben bőrirritációt vagy kiütést okoz, forduljon orvoshoz. Vegye le a szennyezett ruhadarabot és mossa ki, mielőtt újra használná. A reagenst kezelje az érvényben lévő szabályoknak, a laboratóriumi biztonságnak és a helyes laboratóriumi gyakorlatnak megfelelően. Kérésre elérhető a termékhez tartozó biztonsági adatlap. Ehhez lépjen kapcsolatba a technikai ügyfélszolgálattal.
18. Tartsa be a hulladékártalmatlanítási szabályokra vonatkozó nemzeti, regionális és helyi előírásokat.

SZÉKLETMINTÁK LEVÉTELE, KEZELÉSE ÉS TÁROLÁSA

Elfogadható mintatípusok
Friss székletmintákat
Fagyasztott székletmintákat
Mintákat transzportközegben (Cary Blair, C&S)

Ne használjon
Székletmintákat formalin-alapú fixálóban (pl. nátrium-acetát formalin, 10%-os formalin, mertiolát formalin).
Székletmintákat alkoholalapú fixálóban (pl. polivinil-alkohol).

Mintatárolás Hőmérséklet	A tárolás elfogadható hosszúsága	Megjegyzések
2°C – 8°C	72 óra	Az ideális minták 24 óránál újabbak.
Fagyasztott ≤ -10°C	72 óránál hosszabb	Olvassza fel szobahőmérsékleten. A többszörös fagyasztás és felolvasztás a minta aktivitásának elvesztését eredményezheti a toxin degradációja miatt.

1. A székletmintákkal kapcsolatban alkalmazott szabványos, házon belüli mintavételi és kezelési eljárások megfelelők.
2. A székletmintákat tiszta, szivárgásmentes tartályokban kell gyűjteni.
3. A székletmintáknak a *Hígítóban* való tárolása NEM ajánlott.
4. Ne engedje, hogy a székletminták 24 óránál tovább maradjanak a *Hígító/Konjugátum* keverékben.

A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

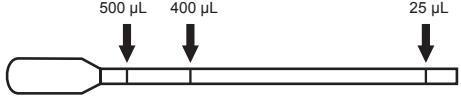
1. Hozza az összes reagenst és a szükséges számú eszközt szobahőmérsékletre használat előtt. Ajánlatos eltávolítani a reagenseket a habbetétből, hogy csökkentsék a szobahőmérsékletre való melegedéshez szükséges időt.
2. Állítson be és jelöljön meg címkével egy kis tesztcsövet minden mintára és opcionális külső kontrollokra vonatkozóan, amint szükséges.
3. A fekete fokbeosztásos csepegtető szerelvény alkalmazásával adjon hozzá 750 µl (2. fokbeosztás a hegytől mérve) *hígítót* mindegyik csőhöz a széklet minták esetében. **A transzportközegben (mint például Cary Blair vagy C&S) lévő minták esetében adjon 650 µl (a csúcstól az 1. beosztás) *Hígítót* a csőhöz.**

Minta típusa	*Hígító* térfogata
Friss székletminták	750 µl (2. fokbeosztás a hegytől)
Fagyasztott székletminták (fagyasztott hígítatlan)	750 µl (2. fokbeosztás a hegytől)
Minták transzportközegben (Cary Blair, C&S)	650 µl (a csúcstól az 1. beosztás)
Külső kontrollok (pozitív és negatív)	750 µl (2. fokbeosztás a hegytől)



4. Adjon egy csepp *Konjugátumot* (piros kupakos üveg) mindegyik csőhöz.
5. Szerezzen be egy eldobható műanyag transzferpipettát (a készlethez mellékelve) minden mintához – a pipetták kiemelt fokbeosztásokkal rendelkeznek 25 µl, 400 µl és 500 µl értéknél.

Fokbeosztásos transzferpipetta:



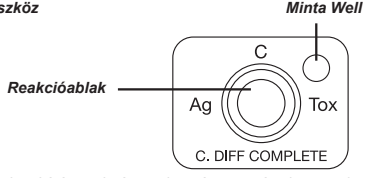
6. **Keverje össze az összes mintát alaposan a konzisztenciától függetlenül - lényeges, hogy az átvitel előtt a minták egyenletesen legyenek szuszpendálva.**
Folyékony/félig szilárd minták – pipettázzon 25 µl mintát transzferpipettával és adagolja a *Hígító/Konjugátum* keverékbe. Használja ugyanazt a transzferpipettát a hígított minta keverésére.
Formázott/Szilárd minták – Ügyelni kell, hogy megfelelő mennyiségű formázott székletet adjanak hozzá a mintakeverékhez. Keverje össze a mintát alaposan fa applikátor pálca használatával és vigye át a minta kis mennyiségét (körülbelül 2 mm átmérőjű, amely 25 µl-rel egyenértékű) a Hígító/Konjugátum keverékbe. Emulgeálja a mintát az applikátor pálca használatával.
Székletminták Cary Blair vagy C&S transzportközegben - pipettázzon 100 µl (2 csepp a transzferpipettából) mintát a *Hígító/Konjugátum* keverékbe.

7. **Opcionális Külső Kontroll Minták:**
   Külső Pozitív Kontroll - adjon hozzá egy csepp *Pozitív Kontrollt* (szürke kupakos üveg) a *Hígító/ Konjugátum* keverékbe.
   Külső Negatív Kontroll - adjon hozzá 25 µl *Hígítót* a *Hígító/Konjugátum* keverékbe.

MEGJEGYZÉS: Ha túl kevés mintát visz át, vagy nem keveri össze és nem szuszpendálja teljesen a mintát a Hígító/Konjugátum keverékben, ez hamis negatív teszteredményt okozhat. A túl sok székletminta hozzáadása érvénytelen eredményeket okozhat a korlátozott mintaáramlás miatt.

TESZTELJÁRÁS

1. Szerezzen be egy *Membráneszközt* mintánként és egy eszközt opcionális külső pozitív vagy negatív kontrollonként, ha szükséges. Az eszközöket tartalmazó fóliazsákokat szobahőmérsékletre kell hozni felnyitás előtt. Az eszközt közvetlenül a nyitás után használja fel. Címkézzen fel minden eszközt megfelelően és irányítsa őket úgy egy sima felületen, hogy a nyomtatott "C. DIFF COMPLETE" felirat az eszköz alján legyen és a kis Minta Well az eszköz jobb felső sarkában legyen.

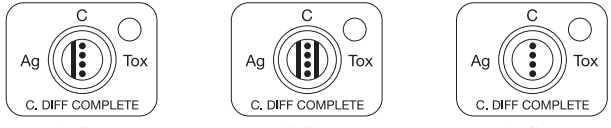


2. Zárjon le minden, hígított mintát tartalmazó csövet és alaposan keverje fel őket. A megfelelő keverés vortexeléssel vagy a cső megfordításával érhető el. Amint a páciens mintája vagy a *Pozitív Kontroll* hígításra került a *Hígító/Konjugátum* keverékben, szobahőmérsékleten inkubálható bármely ideig maximum 24 órával a *Membráneszköz* hozzáadása előtt.
3. Új transzferpipetta alkalmazásával vigyen át 500 µl-t a hígított minta-konjugátum keverékből a *Membrán Eszköz* ***Minta Well-jébe*** (kisebb lyuk az eszköz jobb felső sarkában), gondoskodva arról, hogy a folyékony mintát a *Membráneszköz* belsejében lévő felszívó párnára juttassa. Amikor a mintát betölti a minta wellbe, gondoskodjon arról, hogy a transzferpipetta hegye a *Reakcióablak* (nagyobb lyuk az eszköz közepén) felé dőljön.
4. Inkubálja az eszközt szobahőmérsékleten 15 percig – a minta felszívódik az eszközön keresztül és a nedves terület szétterjed a *Reakcióablakon*.
   MEGJEGYZÉS AZON MINTÁKRA VONATKOZÓAN, AMELYEK MIGRÁCIÓJA SIKERTELEN:
   Bizonyos esetekben a hígított minta nem migrál megfelelően, és a Reakcióablak nem lesz teljesen nedves. Ha a Reakcióablak nem tűnik teljesen nedvesnek 5 perccel azután, hogy a mintát a Minta Well-hez hozzáadták, adjon 100 µl (4 csepp) Hígítót a Minta Well-hez és várjon további 5 percet (összesen 20 percet).
5. Inkubáció után adjon 300 µl *Mosópuffert* a ***Reakcióablakhoz*** a fokbeosztásos fehér cseppentő szerelvény alkalmazásával. Hagyja, hogy a *Mosópuffer* átfolyjon a Reakcióablak membránján, és teljesen felszívódjon.
6. Adjon 2 csepp *Szubsztrátot* (fehér kupakos üveg) a ***Reakcióablakhoz***. Olvassa le és jegyezze fel az eredményeket szemrevételezés után 10 perc múlva.

AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

1. A teszt értelmezése akkor a legmegbízhatóbb, ha az eszközt azonnal leolvassák a 10 perces reakcióidő végén. A készüléket normál működési távolságban, jól megvilágított területen olvassa le. Közvetlenül az eszköz feletti látóvonal mentén tekintse meg.
2. Figyelje meg az eszközt, hogy nem jelennek-e meg kék pontok a *Reakcióablak* közepén, amely a belső pozitív kontrollt képviseli. Bármilyen kontroll pont(ok) megjelenése érvényes belső kontrollt képvisel. A háttér színe fehértől világoskékig terjedhet. Figyelje meg az eszközt, hogy nem jelennek-e meg kék vonalak a *Reakcióablak* "Ag" vagy "Tox" oldalain, amelyek a tesztvonalakat képviselik A vonalak intenzitása halványtól sötétig terjedhet.
3. **Pozitív Antigén ("Ag") Eredmény:** A pozitív antigén eredmény értelmezhető bármikor a *Szubsztrát* hozzáadása és a 10 perces leolvasási időpont között. Pozitív antigén eredmény esetén a zöld "Ag" vonal és a "C" alatti szaggatott kék kontrollvonal látható (1a ábra). A vonalak intenzitása halványtól sötétig terjedhet. A feltűnő részleges <u>vonal</u> pozitív eredményként értelmezendő. Ne értelmezze a membrán elszíneződését pozitív eredményként. A pozitív eredmény a *C. difficile* jelenlétét mutatja.
4. **Pozitív Antigén és Toxin ("Tox") Eredmény:** Ha az antigén eredmény pozitív (azaz kék "Ag" vonal és szaggatott kék kontrollvonal látható a "C" alatt), folytassa a toxin eredmény értelmezésével. A pozitív toxin eredmény értelmezhető bármikor a *Szubsztrát* hozzáadása és a 10 perces leolvasási időpont között. Pozitív toxin eredmény esetében kék "Tox" vonal látható (1b ábra). A vonal intenzitása halványtól sötétig terjedhet. A feltűnő részleges <u>vonal</u> pozitív eredményként értelmezendő. Ne értelmezze a membrán elszíneződését pozitív eredményként. A pozitív eredmény a *C. difficile* toxin jelenlétét mutatja.
5. **Negatív Eredmény:** A teszt nem értelmezhető negatívként vagy érvénytelenként a *Szubsztrát* hozzáadását követő 10 percig. Egyetlen kék szaggatott vonal látható a *Reakcióablak*, közepén a "C" alatt és nem látható tesztvonal a *Reakcióablak* "Ag" vagy "Tox" oldalán (1c ábra). Az antigén részben lévő negatív eredmény azt jelzi, hogy a *C. difficile* vagy nincs jelen a mintában vagy a teszt kimutatási határa alatt van. A toxin részben lévő negatív eredmény azt jelzi, hogy a C. difficile toxin vagy nincs jelen a mintában vagy a teszt kimutatási határa alatt van.
6. **Érvénytelen Eredmény:** Nem látható vonal a Reakcióablakban (1d ábra). A teszteredmény érvénytelen, ha a kék szaggatott vonal nincs jelen a "C" alatt a reakcióidő befejeződésekor (1e, 1f, 1g ábra).
7. **Negatív Antigén ("Ag"), Pozitív Toxin ("Tox").** A minták alacsony százalékos hányada negatív teszteredményt mutathat az antigénre de pozitívat a toxinra vonatkozóan. E mintákat bizonytalannak kell tekinteni, majd friss mintával újra kell tesztelni (1h ábra). Ha a minta újratesztelésekor negatívnak bizonyul az antigénre, de pozitívnak a toxinra vonatkozóan, pozitív toxin eredményként kell jegyzőkönyvezni.

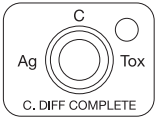
<u>1. ÁBRA</u>: *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE



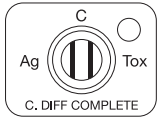
1a ábra
Pozitív Antigén Eredmény

1b ábra
Pozitív Antigén
és Toxin Eredmény

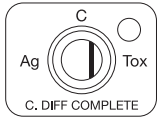
1c ábra
Negatív Eredmény



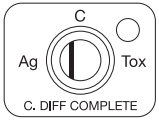
1d ábra
Érvénytelen Eredmény



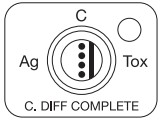
1e ábra
Érvénytelen Eredmény



1f ábra
Érvénytelen Eredmény



1g ábra
Érvénytelen Eredmény



1h ábra
Az értelmezést lásd a 7. pontban

MINŐSÉGELLENŐRZÉS

Belső: Szaggatott kék vonalnak kell látszódnia a *Reakcióablak* közepén a "C" alatt, minden tesztelt *Membráneszköz* alatt. A kék kontrollpontok megjelenése igazolja, hogy a mintát és a reagenseket megfelelően adták hozzá, és hogy a reagensek aktívak voltak az assay elvégzése idején, valamint, hogy a minta megfelelően átmigrált a *Membráneszközön*. Továbbá megerősíti az assay-vel kapcsolatos többi reagens reaktivitását. Az eredmények területén lévő világos háttér belső negatív kontrollként tekintendő. Ha a tesztet helyesen végezték és a reagensek megfelelően működnek, a háttér fehér lesz, hogy észrevehető eredményt adjon.

Külső: A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® készlet reaktivitását ellenőrizni kell átvételkor a *Pozitív Kontroll* és a negatív kontroll (*Hígító*) használatakor. A *Pozitív Kontroll* a készlethez van mellékelve (szürke kupakos üveg). A *Pozitív Kontroll* igazolja az assay-vel kapcsolatos többi reagens reaktivitását, és nem rendeltetése, hogy biztosítsa a precizitást az analitikai assay cut-off értékénél. A *Hígító* negatív kontroll céljára használatos. További tesztek végezhetők a kontrollokkal, hogy eleget tegyenek a helyi, állami és/vagy szövetségi szabályozásoknak és/vagy az akkreditáló szervezeteknek.

KORLÁTOZÁSOK

1. A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt a C. difficile antigén és toxin(ok) detektálására használatos székletmintákban. A teszt igazolja a toxin jelenlétét a székletben, és ezt az információt figyelembe kell vennie az orvosnak a páciens klinikai körtörténete és fizikális vizsgálata fényében. A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®az A toxint ≥0,63 ng/ml, a B toxint ≥0,16 ng/ml,és a glutamát-dehidrogenázt ≥0,8 ng/ml szinteken mutatja ki.
2. A székletminták rendkívül komplexek. A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszttel optimális eredmények olyan mintákkal érhetők el, amelyek 24 óránál újabbak. A legtöbb hígítatlan minta tárolható 2°C és 8°C között 72 órán át, mielőtt a toxin jelentős bomlása figyelhető meg. Ha a mintákat nem vizsgálják meg ezen időszakon belül, ezek lefagyaszthatók, majd felolvaszthatók. Azonban, az ismételt lefagyasztás és felolvasztás az antigén, valamint az A és B toxinok immunreaktivitásának elvesztését eredményezi.
3. Bizonyos minták gyenge reakciókat adnak. Ezt számos tényező okozhatja, mint például alacsony szintű antigén és/vagy toxin jelenléte, a kötőanyagok vagy inaktiváló enzimek jelenléte a székletben. A vonalak intenzitása halványtól sötétig terjedhet. Ezeket a mintákat pozitívként kell jegyzőkönyvezni, ha bármilyen kék vonal jelenik meg (még, ha részleges is). A feltűnő részleges kék vonal pozitív eredményként értelmezendő.
4. A 10%-os formalinban, mertiolát-formalinban, nátrium-acetát formalinban vagy polivinil-alkoholban tartósított székletminták nem használhatók.
5. A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt kvalitatív. A szín intenzitása nem értelmezhető kvantitatív módon.
6. A *C. sordellii* néhány izolátuma reagálhat a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt során az immunológiailag kapcsolódó toxinok termelődése miatt (1).
7. Csecsemőkben akár 50%-os kolonizációs arányokról számoltak be. Magas arányról számoltak be a cisztás fibrózisban szenvedő betegekben (1,3). Az eredmények pozitívként jelentkezhetnek e csoportokban, de ezeket úgy kell tekinteni, mint potenciális kolonizált hordozókat.
8. Az egyetlen nem-*C. difficile* organizmus, amely reagál a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt toxin részében a *Clostridium sordellii* VPI 9048 volt. Ez a törzs a HT és az LT toxinokat termeli, amelyek az A ill. B toxinokra vonatkozóan homológok.
9. Semmilyen adat nem létezi a vastagbélmosásoknak, báriumbeöntéseknek, hashajtóknak vagy vastagbélkészítményeknek a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt teljesítményére gyakorolt hatására vonatkozóan. Ezen eljárások mindegyike nagymértékű hígulást okozhat vagy olyan adalékanyagok jelenlétét eredményezheti, amely befolyásolhatja a teszt teljesítményét.

VÁRHATÓ ÉRTÉKEK

A *Clostridium difficile* elsősorban nozokomiális betegség idős páciensekben, és a betegség gyakorisága olyan tényezőktől függ, mint a betegpopuláció, az intézmény típusa és az epidemiológia. A *C. difficile* betegség bejelentett előfordulási gyakorisága antibiotikumokkal kapcsolatos hasmenésben szenvedő páciensekben 5-től 20%-ig terjedhet, és a kórházakban e tartománynál alacsonyabb vagy magasabb értékek is jelentkezhetnek. Fontos figyelembe venni bármilyen teszteredményt a klinikai tünetekkel kapcsolatban, mivel néhány egészséges felnőtt és nagy számú egészséges csecsemő (akár 50%-os arányban is) pozitív eredményt mutat a *C. difficile* toxinra vonatkozóan. Továbbá, 22%-tól 32%-ig terjedő *C. difficile* hordozási arányokról számoltak be a cisztás fibrózisban szenvedő betegekben (1,3). A jelen eszközre vonatkozóan tüneteket mutató betegekkel végzett vizsgálatok során az A és B toxin előfordulása 12%, a GDH előfordulása 18% volt. A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt antigén részének pozitív eredménye megerősíti a *C. difficile* jelenlétét a székletmintában; a negatív eredmény az organizmus hiányát jelzi. A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt antigén részének pozitív eredménye megerősíti a *C. difficile* toxin jelenlétét a székletmintában; a negatív eredmény a toxin hiányát jelzi, vagy azt, hogy nem áll rendelkezésre a kimutatáshoz elegendő koncentrációban.

TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt antigén részének klinikai értékelése

A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt antigén részét baktériumkultúrához hasonlították. A kiértékelésben szereplő mintákat klinikai laboratóriumokba küldték be rutin tesztelés céljára. A bakteriális kultúra tesztjét házon belüli eljárásokkal végezték. Az eredményeket az 1. táblázat mutatja

1. táblázat A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt és a bakteriális kultúra összehasonlításának klinikai teljesítménye

n = 1126	Bakteriális Kultúra Pozitív	Bakteriális Kultúra Negatív
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigén Vonal Pozitív	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigén Vonal Negatív	21	842

		95% Konfidenciahatárok
Érzékenység	90,5%	85,7 – 93,9
Specificitás	93,1%	91,2 – 94,7
Prediktív Pozitív Érték	76,4%	70,7 – 81,3
Prediktív Negatív Érték	97,6%	96,2 – 98,4
Korreláció	92,6%	91,8 – 93,4

Az eltérő mintákat a *C. difficile* glutamát-dehidrogenázra vonatkozó aktuális ELISA tesztek alkalmazásával értékelték.
A 62 álpozitív mintából huszonkilenc pozitív volt egy másik GDH teszt során, és ezeket valódi pozitívnak tekintették.
A 21 álnegatív mintából tizenhárom negatív volt egy másik GDH teszt során, és ezeket valódi negatívnak tekintették.

A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® tesztet a szövetkultúra assay-hez hasonlították a C. difficile toxin kimutatására vonatkozóan. A kiértékelésben szereplő mintákat klinikai laboratóriumokba küldték be rutin tesztelés céljára. Az eredményeket a 2. táblázat mutatja. A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® a szövetkultúra pozitív mintáinak 98,7%-át kimutatta.

2. táblázat A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt és a szöveti kultúra assay összehasonlításának klinikai teljesítménye

n = 1126	Szöveti Kultúra Pozitív	Szöveti Kultúra Negatív
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigén Vonal Pozitív	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigén Vonal Negatív	2	861

A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt toxin részének klinikai értékelése
A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt toxin részét összehasonlították a szövetkultúra assay-vel két klinikai laboratóriumban és házon belül a TECHLAB®, Inc vállalatnál. A kiértékelésben szereplő mintákat klinikai laboratóriumokhoz juttatták el rutin tesztelés céljára. Az eredményeket az 3. táblázat mutatja

3. táblázat A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt és a szöveti kultúra assay összehasonlításának klinikai teljesítménye

n = 1126	Szöveti Kultúra Pozitív	Szöveti Kultúra Negatív
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxin Vonal Pozitív	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxin Vonal Negatív	19	964

		95% Konfidenciahatárok
Érzékenység	87,8%	81,4 - 92,3
Specificitás	99,4%	98,6 - 99,7
Prediktív Pozitív Érték	95,8%	90,7 - 98,3
Prediktív Negatív Érték	98,1%	96,9 - 98,8
Korreláció	97,8%	97,6 - 98,0

Az eltérő mintákat az A és B toxinokra vonatkozó aktuális ELISA tesztek alkalmazásával értékelték.
A 6 álpozitív mintából öt pozitív volt az ELISA során, és ezeket valódi pozitívnak tekintették.
A 19 álnegatív mintából tizenkettő negatív volt egy ELISA teszt során, és ezeket valódi negatívnak tekintették.

A SZÉKLETMINTA KONZISZTENCIÁJÁNAK HATÁSA

A székletminta konzisztenciájának hatása a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® tesztre
A különböző konzisztenciájú székletminták reakcióját a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt antigén részében (n=978) és toxin részében (n=981) a 4. és az 5. táblázat mutatja. A kultúra assay vagy a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® alkalmazásával kapott pozitív reakciók százalékértékei hasonlóak voltak mindhárom típusú székletminta esetén (folyékony, félig szilárd és szilárd). Az összes mintát beküldték C. difficile tesztelés céljára. A beküldés alapja a beteg klinikai kórtörténete volt, és nem a minta konzisztenciája. Az antigén részben az eredmények azt mutatják, hogy a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt hasonló teljesítményt nyújtott, mint a baktériumkultúra a különböző konzisztenciájú minták tesztelésekor. A toxin részben az eredmények azt mutatják, hogy a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt hasonló teljesítményt nyújtott, mint a szövetkultúra assay a különböző konzisztenciájú minták tesztelésekor.

4. táblázat Különböző konzisztenciájú székletminták reakciója az antigén részben a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt során.

Minták száma (n = 978)	Folyékony Minták (n = 335)	Félig szilárd Minták (n = 522)	Szilárd Minták (n = 121)
Pozitív a bakteriális kultúra assay szerint	59 (17,6%)	110 (21,1%)	19 (15,7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigén Vonal Pozitív	72 (21,5%)	128 (24,5%)	25 (20,7%)
Negatív a bakteriális kultúra assay szerint	276 (82,4%)	412 (78,9%)	102 (84,3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigén Vonal Negatív	263 (78,5%)	394 (75,5%)	96 (79,3%)

5. táblázat Különböző konzisztenciájú székletminták reakciója a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt toxin részében.

Minták száma (n = 981)	Folyékony Minták (n = 336)	Félig szilárd Minták (n = 523)	Szilárd Minták (n = 122)
Pozitív a szöveti kultúra assay szerint	43 (12,8%)	81 (15,5%)	8 (6,6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxin Vonal Pozitív	42 (12,5%)	72 (13,8%)	7 (5,7%)
Negatív a szöveti kultúra assay szerint	293 (87,2%)	442 (84,5%)	114 (93,4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxin Vonal Negatív	294 (87,5%)	451 (86,2%)	115 (94,3%)

ANALITIKAI ÉRZÉKENYSÉG

Az assay cutoff értékét 0,63 ng/ml koncentrációban határozták meg az A toxinra, 0,16 ng/ml koncentrációban a B toxinra és 0,8 ng/ml koncentrációban a glutamát-dehidrogenázra vonatkozóan.

REPRODUKÁLHATÓSÁG

A *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt reprodukálhatóságát 12 olyan székletminta alkalmazásával határozták meg, amelyeket kódoltak, hogy megakadályozzák az azonosításukat a tesztelés során. A tesztelést 3 független laboratóriumban végezték el, amelyek a mintákat 3 napon át vizsgálták. A minták az esetek 100%-ában a várt eredményeket produkálták.

KERESZTREAKTIVITÁS

A következő mikroorganizmusokkal beoltott székletminták a ml-enként 10^8 vagy annál nagyobb számú végső organizmus-koncentráció esetén nem reagáltak a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt antigén- vagy toxin részével:

Baktérium vagy Patogén: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (nem toxigén), *Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans), *Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

Az egyetlen nem-*C. difficile* organizmus, amely reagál a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszt toxin részében, a *Clostridium sordellii* VPI 9048 volt. Ez a törzs a HT és az LT toxinokat termeli, amelyek az A ill. B toxinokra vonatkozóan homológok.

A következő vírusok 0,2 ml-enként $10^{3.3}$ - $10^{8.25}$ TCID egység értékekkel nem reagáltak a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® tesztben:

Vírusok: Adenovirus típusok: 1, 2, 3, 5, 40, 41, Human koronavírus, Coxsackievírus B2, B3, B4, B5, Echovirus 9, 11, 18, 22, 33, Enterovirus típus: 68, 69, 70, 71, Rotavírus.

ZAVARÓ ANYAGOK

A következő anyagok (USA-készítmény) nem gyakoroltak hatást a teszteredményekre, ha a jelzett koncentrációkban voltak jelen a székletben: mucin (3,5% w/v), emberi vér (40% v/v), bárium-szulfát (5% w/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), sztearinsav/palmitinsav (40% w/v), Metronidazole (0,25% w/v), Vancomycin (0,25% w/v).

KLINIKAI IZOLÁTUMOK CIKLOSZERIN-CEFOXITIN-FRUKTÓZ AGARON (CCFA) TÖRTÉNŐ REAKCIÓJA

Összesen 103 *C. difficile* klinikai izolátumot, amelyeket anaerob bakteriális kultúra révén nyertek CCFA-n 3 nap után 37°C-on, vizsgáltak a *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teszttel. Az analízis céljára egyedi kolóniákat választottak ki és szuszpendálták őket *Higítóban* a székletmintákra vonatkozóan ajánlott módon. Mind a 103 izolátum pozitív antigénreakciót adott a teszt során.

A 103 izolátumból hetven (68%) olyan székletmintából származott, amely pozitív volt a *C. difficile* toxinra vonatkozóan a szövetkultúra assay során. Ezek közül 56 (80%) pozitív toxinreakciót adott, amikor anaerob növekedés után vizsgálták CCFA-n 3 napon át 37°C-on.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

FINALITA' DEL DOSAGGIO

Il test TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* è un dosaggio immunoenzimatico rapido a membrana per il rilevamento simultaneo dell'antigene glutammato deidrogenasi e dalle tossine A e B di *Clostridium difficile* in un singolo pozzetto di reazione. Il test rileva l'antigene glutammato deidrogenasi di *C. difficile* quale screening per la presenza di *C. difficile* e conferma la presenza di *C. difficile* tossigeno rilevando le tossine A e B nei campioni fecali delle persone in cui si sospetti malattia da *C. difficile*. Il test deve essere usato come ausilio nella diagnosi di malattia da *C. difficile*. Come per gli altri test per il *C. difficile*, i risultati devono essere considerati insieme alla storia del paziente.

SPIEGAZIONE

In seguito al trattamento con antibiotici, molti pazienti sviluppano problemi gastrointestinali che vanno dalla diarrea lieve alla colite pseudomembranosa grave. Molti casi delle forme più lievi di malattia gastrointestinale e la maggior parte dei casi di colite pseudomembranosa sono causati da ceppi tossigeni di *Clostridium difficile* (1). Questo organismo è un batterio anaerobico opportunista che cresce nell'intestino una volta che la normale flora è stata alterata dall'antibiotico. I ceppi tossigeni di *C. difficile* trasportano i geni che codificano le tossine, mentre i ceppi non tossigeni non trasportano i geni delle tossine. L'esordio della malattia è associato alle tossine che vengono prodotte dagli organismi tossigeni. Si ritiene che i sintomi clinici associati alla malattia siano prevalentemente dovuti alla tossina A, che è un'enterotossina che danneggia i tessuti (2,3). Il *C. difficile* produce anche una seconda tossina, chiamata tossina B. La tossina B, che è stata indicata come la citotossina dell'organismo, è la tossina rilevata dal test di coltura tissutale attualmente usato da molti laboratori. I ceppi di *C. difficile* tossigeno producono entrambe le tossine o solo la tossina B (4-7). La glutammato deidrogenasi del *C. difficile* è un buon marker antigenico dell'organismo nelle feci in quanto è prodotta in elevate quantità da tutti i ceppi, sia quelli tossigeni sia quelli non tossigeni (8-10). L'antigene può essere rilevato nei campioni fecali utilizzando il test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Un risultato positivo al test della glutammato deidrogenasi del *C. difficile* conferma la presenza di questo organismo nei campioni fecali; un risultato negativo indica l'assenza dell'organismo. Un risultato positivo al test per le tossine A e B conferma la presenza di *C. difficile* tossigeno.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* utilizza anticorpi specifici per la glutammato deidrogenasi e le tossine A e B del *C. difficile*. Il dispositivo contiene una finestra di reazione con tre linee verticali di anticorpi immobilizzati. La linea di test dell'antigene ("Ag") contiene anticorpi contro la glutammato deidrogenasi *C. difficile*. La linea di controllo ("C") è una linea punteggiata che contiene anticorpi anti-perossidasi di rafano (HRP). La linea delle tossine A e B ("Tox") contiene anticorpi contro le tossine A e B di *C. difficile*. Il *coniugato* comprende anticorpi alla glutammato deidrogenasi e anticorpi alle tossine A e B accoppiate a perossidasi di rafano. Per eseguire il test, il campione viene dispensato in una provetta contenente una miscela di *diluente* e *coniugato*. La miscela di campione diluito e coniugato viene dispensata nel *pozzetto del campione* e il dispositivo viene lasciato ad incubare a temperatura ambiente per 15 minuti. Durante l'incubazione, qualsiasi glutammato deidrogenasi e tutte le tossine A e B presenti nel campione si legano ai coniugati anticorpo-perossidasi. I complessi antigene-anticorpo-coniugato migrano attraverso un tampone filtrante su una membrana dove vengono catturati dagli anticorpi immobilizzati specifici per la deidrogenasi e specifici per le tossine A e B nelle linee. La *finestra di reazione* viene quindi risciacquata con *tampone di lavaggio* a cui segue l'aggiunta di *substrato*. Dopo un periodo di incubazione di 10 minuti, la regione "Ag" viene esaminata visivamente e viene verificata la comparsa di una linea verticale blu sul lato "Ag" della *finestra di reazione*. Una linea blu indica un test positivo. Se l'"Ag" è positivo, è necessario esaminare la reazione "Tox" per controllare se compare una linea blu sul lato "Tox" della *finestra di reazione*. Una linea blu indica un test positivo. Una reazione "C" positiva, indicata da una linea blu verticale punteggiata sotto la parte "C" della *finestra di reazione*, conferma che il test sta funzionando correttamente e che i risultati sono validi.

MATERIALI FORNITI

MEM | DEV — ***Dispositivi a membrana*** – Ogni busta contiene 1 dispositivo

DIL | SPE — ***Diluente* (22 mL per flacone)** – Soluzione proteica tamponata con contagocce graduato (contiene lo 0,05% di ProClin® 300)*

WASH | REAG — ***Tampone di lavaggio* (12 mL per flacone)** – Soluzione tamponata con contagocce graduato (contiene lo 0,05% di ProClin® 300)*

SUBS | REAG — ***Substrato* (3,5 mL per flacone)** – Soluzione contenente tetrametilbenzidina

CONJ | ENZ — ***Coniugato* (2,5 mL per flacone)** – Anticorpo monoclonale murino specifico per la glutammato deidrogenasi accoppiato a perossidasi di rafano e anticorpi policlonali di capra specifici per le tossine A e B accoppiati a perossidasi di rafano in una soluzione proteica tamponata (contiene lo 0,05% di ProClin® 300)*

CONTROL | + — ***Controllo positivo* (2 mL)** – Antigene in una soluzione proteica tamponata

Pipette di trasferimento in plastica monouso – graduate a 25 µL, 400 µL e 500 µL

IVD — Per uso diagnostico *in vitro*

*Parola d'avviso: Avvertenza
H317: Può causare una reazione allergica sulla pelle
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

MATERIALI E APPARECCHIATURE RICHIESTI MA NON FORNITI

Provette piccole (p.es., provette Eppendorf in plastica o provette in vetro)
Stick applicatori *Timer* *Vorticatore*
Guanti monouso per la manipolazione dei campioni fecali *Pipettatore e puntali*

VITA UTILE E CONSERVAZIONE A MAGAZZINO

La data di scadenza del kit è stampata sull'etichetta. Le date di scadenza di ciascun componente sono indicate sulle rispettive etichette. Il kit deve essere conservato a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.

PRECAUZIONI

1. Non miscelare e scambiare reagenti di kit diversi. Non utilizzare un kit dopo la data di scadenza.
2. Ogni componente del kit deve essere controllato per rilevare eventuali segni di perdita. All'arrivo, controllare il kit per assicurarsi che i componenti non siano né congelati né caldi al tatto a causa di condizioni di spedizione inadeguate.
3. Portare tutti i componenti a TEMPERATURA AMBIENTE PRIMA DELL'USO!
4. I cappucci, i puntali e i contagocce seguono un codice colore; NON mischiarli o scambiarli!
5. Non congelare i reagenti. Il kit deve essere conservato a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.

6. Prima dell'apertura, la busta contenente il *dispositivo a membrana* deve essere a temperatura ambiente. Prima dell'uso conservare i dispositivi a membrana all'asciutto.
7. Per ottenere i risultati ottimali, utilizzare i campioni fecali entro 72 ore dalla raccolta. I campioni congelati possono perdere attività in seguito al congelamento e allo scongelamento. Se si utilizzano campioni scongelati, lasciarli scongelare a temperatura ambiente.
8. Dispensare i reagenti tenendo i flaconi in posizione verticale in modo da garantire una dimensione costante delle gocce e un volume corretto.
9. I campioni e i dispositivi a membrana devono essere manipolati e smaltiti come materiale biologico potenzialmente infetto dopo l'uso.
10. I dispositivi a membrana non possono essere riutilizzati.
11. Il test è stato ottimizzato per quanto concerne la sensibilità e la specificità. Eventuali alterazioni della procedura specificata e/o delle condizioni di test possono influenzare la sensibilità e la specificità del test. Non deviare dalla procedura specificata.
12. Prestare attenzione al tempo totale di dosaggio quando si analizza più di un campione fecale. Dispensare dapprima il *diluente*, quindi aggiungere il *coniugato* a ogni provetta di *diluente*. Quindi dispensare il campione nella provetta di *diluente*/*coniugato*. Miscelare accuratamente tutti i campioni diluiti e trasferirli nel *dispositivo a membrana*. La fase di incubazione di 15 minuti comincia dopo che l'ultima miscela di campione diluito-coniugato è stata trasferita nel *dispositivo a membrana* finale.
13. Se il reagente *substrato* assume un colore blu scuro/viola, contattare il servizio tecnico e chiedere la sostituzione.
14. I campioni fecali possono contenere agenti potenzialmente infettivi e devono essere maneggiati al "Livello di biosicurezza 2" come raccomandato nel manuale del CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories."
15. Tutti i reagenti sono destinati al solo uso diagnostico *in vitro*.
16. Durante il test, indossare guanti monouso.
17. I reagenti contengono 0,05% di ProClin® 300 come conservante. Benché la concentrazione sia bassa, è noto che ProClin® 300 è dannoso. In caso di irritazione o rash cutaneo, rivolgersi a un medico. Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli. Maneggiare i reagenti attenendosi alle disposizioni vigenti in materia di sicurezza e buone pratiche di laboratorio. Le schede tecniche di sicurezza per questo prodotto sono disponibili dietro richiesta; rivolgersi all'assistenza tecnica.
18. Attenersi alle disposizioni nazionali, regionali e locali per quanto riguarda lo smaltimento dei rifiuti.

RACCOLTA, CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI FECALI

Tipi di campioni accettabili
Campioni fecali freschi
Campioni fecali congelati
Campioni in mezzi di trasporto (Cary Blair, C&S)

Non usare
Campioni fecali in un fissativo a base di formalina (p.es. formalina di sodio acetato, formalina al 10%, mertiolato e formalina)
Campioni fecali in un fissativo a base di alcol (p.es. alcol polivinilico)

Conservazione dei campioni Temperatura	Durata di conservazione accettabile	Commenti
2° – 8°	72 ore	I campioni ideali hanno meno di 24 ore
Congelato ≤ -10°C	Più di 72 ore	Scongelare a temperatura ambiente. Il congelamento e lo scongelamento ripetuti possono comportare una perdita dell'attività dei campioni in seguito a degradazione delle tossine.

1. Le procedure di raccolta e manipolazione standard utilizzate internamente per i campioni fecali sono appropriate.
2. I campioni di feci devono essere raccolti in contenitori di puliti, ermetici.
3. La conservazione dei campioni di feci nel *diluente* NON è consigliata.
4. Non lasciare i campioni nella miscela di *diluente*/*coniugato* per >24 ore.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

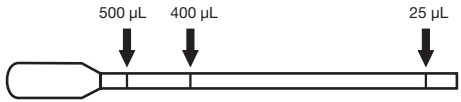
1. Portare tutti i reagenti e il numero di dispositivi richiesto a temperatura ambiente prima dell'uso. Si raccomanda di rimuovere i reagenti dall'inserto in espanso per ridurre il tempo necessario per il riscaldamento a temperatura ambiente.
2. Preparare ed etichettare una provetta piccola per ogni campione e i controlli esterni opzionali in base alla necessità.
3. Utilizzando un contagocce graduato nero, dispensare 750 µL (2° graduazione sul puntale) di *diluente* in ogni provetta per campioni fecali. **Per i campioni nei mezzi di trasporto come Cary Blair o C&S, dispensare 650 µL (1° graduazione dalla punta) di *diluente* nella provetta.**

Tipo di campione	Volume di *diluente*
Campioni fecali freschi	750 µL (2° graduazione sul puntale)
Campioni fecali congelati (congelati non diluiti)	750 µL (2° graduazione sul puntale)
Campioni in mezzi di trasporto (Cary Blair, C&S)	650 µL (1° graduazione dalla punta)
Controlli esterni (positivo e negativo)	750 µL (2° graduazione sul puntale)



4. Dispensare una goccia di *coniugato* (flacone con tappo rosso) in ogni provetta.
5. Preparare una pipetta di trasferimento in plastica monouso (fornita con il kit) per ogni campione – le pipette hanno graduazioni in rilievo in corrispondenza di 25 µL, 400 µL e 500 µL.

Pipetta di trasferimento graduata:



6. **Miscelare accuratamente tutti i campioni, indipendentemente dalla consistenza - è fondamentale che i campioni siano uniformemente sospesi prima del trasferimento.** Campioni liquidi/semi-solidi – pipettare 25 µL di campione con una pipetta di trasferimento e dispensare nella miscela di *diluente*/*coniugato*. Utilizzare la stessa pipetta di trasferimento per miscelare i campioni diluiti.

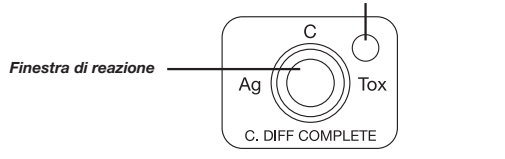
Campioni formati/solidi – Occorre prestare attenzione e dispensare la quantità corretta di feci formate nella miscela del campione. Miscelare accuratamente il campione utilizzando uno stick in legno e trasferire una piccola porzione (circa 2 mm di diametro, l'equivalente di 25 µL) del campione nella miscela di diluente/coniugato. Emulsionare i campioni utilizzando lo stick.
Campioni fecali nei mezzi di trasporto Cary Blair o C&S - pipettare 100 µL (2 gocce dalla pipetta di trasferimento) di campione nella miscela di *diluente/coniugato*.

7. **Campioni di controllo esterni opzionali:**
Controllo positivo esterno - dispensare una goccia di *controllo positivo* (flacone con il cappuccio grigio) nella miscela di *diluente/coniugato*.
Controllo negativo esterno - dispensare 25 µL di *diluente* nella miscela di *diluente/coniugato*.

NOTA: il trasferimento di una quantità insufficiente di campione o la mancata miscelazione e sospensione completa del campione nella miscela di diluente/coniugato possono dare un risultato falsamente negativo. La dispensazione di una quantità eccessiva di campione può causare risultati non validi a causa del flusso di campione limitato.

PROCEDURA DEL TEST

1. Prendere un *dispositivo a membrana* per campione e un dispositivo per controllo positivo o negativo esterno opzionale, in base alla necessità. Le buste in alluminio contenenti i dispositivi devono essere portate a temperatura ambiente prima dell'apertura. Utilizzare il dispositivo immediatamente dopo l'apertura. Etichettare ogni dispositivo in modo appropriato e orientarlo su una superficie piana in modo che la scritta "C. DIFF COMPLETE" si trovi sul fondo del dispositivo e il piccolo pozzetto per il campione si trovi nell'angolo in alto a destra del dispositivo.



2. Chiudere ogni provetta di campione diluito e miscelare accuratamente. L'accurata miscelazione può essere ottenuta mediante vorticazione o capovolgendo la provetta. Dopo che il campione o il *controllo positivo* è stato diluito nella miscela di *diluente/coniugato*, lo stesso può essere incubato a temperatura ambiente per un periodo di tempo fino a 24 ore prima di dispensarlo nel *dispositivo a membrana*.
3. Utilizzando la pipetta di trasferimento, trasferire 500 µL della miscela diluita di campione-coniugato nel ***pozzetto del campione*** (foro piccolo nell'angolo in alto a destra del dispositivo) di un *dispositivo a membrana*, assicurandosi di espellere il campione di liquido su un tampone di drenaggio all'interno del *dispositivo a membrana*. Durante il caricamento del campione nel pozzetto per campioni, assicurarsi che la punta della pipetta di trasferimento sia rivolta verso la *finestra di reazione* (foro più grande al centro del dispositivo).
4. Incubare il dispositivo a temperatura ambiente per 15 minuti – il campione drenerà attraverso il dispositivo e un'area umida si diffonderà attraverso la *finestra di reazione*.
NOTA PER I CAMPIONI CHE NON MIGRANO:
può accadere che un campione diluito non migri correttamente e che la finestra di reazione non si inumidisca completamente. Se la finestra di reazione non sembra essere completamente umida entro 5 minuti dalla dispensazione del campione nel pozzetto del campione, dispensare 100 µL (4 gocce) di diluente nel pozzetto del campione e attendere altri 5 minuti (per un totale di 20 minuti).
5. Dopo l'incubazione, aggiungere 300 µL di *tampone di lavaggio* alla ***finestra di reazione*** utilizzando il contagocce bianco graduato. Lasciare che il *tampone di lavaggio* fluisca attraverso la membrana della finestra di reazione e venga completamente assorbito.
6. Dispensare 2 gocce di *substrato* (flacone con cappuccio bianco) alla ***finestra di reazione***. Leggere e registrare visivamente i risultati dopo 10 minuti.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. L'interpretazione del test è più affidabile quando il dispositivo viene letto immediatamente dopo lo scadere del periodo di reazione di 10 minuti. Leggere il dispositivo a una distanza di lavoro normale in un'area ben illuminata. Osservare con una linea d'osservazione direttamente sul dispositivo.
2. Osservare se nel dispositivo al centro della *finestra di reazione* compaiono punti blu che rappresentano il controllo positivo interno. La comparsa di punti di controllo indica un controllo interno valido. Lo sfondo può avere un colore da bianco ad azzurro. Osservare se sui lati "Ag" e "Tox" della *finestra di reazione* compaiono linee blu che rappresentano le linee di test. Le linee possono avere un'intensità da debole a scura.
3. **Risultato con antigene positivo ("Ag"):** un risultato con antigene positivo può essere interpretato in qualunque momento tra la dispensazione del *substrato* e il tempo di lettura di 10 minuti. In un risultato con antigene positivo, la linea "Ag" blu e la linea di controllo blu punteggiata sotto "C" sono visibili (Figura 1a). Le linee possono avere un'intensità da debole a scura. Una linea parziale evidente viene interpretata come un risultato positivo. Non interpretare un'alterazione di colore della membrana come un risultato positivo. Un risultato positivo indica la presenza di *C. difficile*.
4. **Risultato con antigene e tossina ("Tox") positivi:** se il risultato dell'antigene è positivo (ovvore sotto la "C" sono visibili una linea "Ag" blu e un controllo blu punteggiato), procedere all'interpretazione del risultato delle tossine. Un risultato positivo per le tossine può essere interpretato in qualunque momento tra la dispensazione del *substrato* e il tempo di lettura di 10 minuti. In un risultato positivo per le tossine, è visibile una linea blu "Tox" (Figura 1b). La linea può avere un'intensità da debole a scura. Una linea parziale evidente viene interpretata come un risultato positivo. Non interpretare un'alterazione di colore della membrana come un risultato positivo. Un risultato positivo indica la presenza di tossina *C. difficile*.
5. **Risultato negativo:** un test non può essere interpretato come negativo o non valido fino a 10 minuti dopo la dispensazione del *substrato*. Sotto la "C" al centro della *finestra di reazione* è visibile una singola linea punteggiata blu e sul lato "Ag" o "Tox" della *finestra di reazione* non sono visibili linee di test (Figura 1c). Un risultato negativo nella porzione dell'antigene indica che l'antigene *C. difficile* è assente nel campione oppure è al di sotto del limite di rilevazione del test. Un risultato negativo nella porzione della tossina indica che la tossina C. difficile è assente nel campione oppure è al di sotto del limite di rilevazione del test.
6. **Risultato non valido:** non sono visibili linee nella finestra di reazione (Figura 1d). Il risultato del test non è valido se al termine del periodo di reazione non è presente una linea punteggiata blu sotto la "C" (Figure 1e, 1f, 1g).
7. **Antigene negativo ("Ag"), tossina positiva ("Tox"):** una percentuale ridotta di campioni può risultare negativa all'antigene ma positiva alla tossina. Questi campioni devono essere considerati come indeterminati e sottoposti nuovamente a test con un campione fresco (Figura 1h). Se il campione risulta nuovamente negativo per l'antigene ma positivo per la tossina, segnalare il risultato come positivo per la tossina.

FIGURA 1: INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL TEST *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

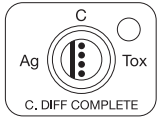


Figura 1a
Risultato con antigene positivo

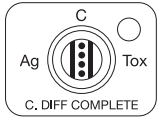


Figura 1b
Risultato con antigene e tossina positivi

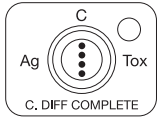


Figura 1c
Risultato negativoi

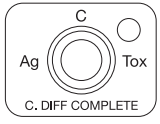


Figura 1d
Risultato non valido

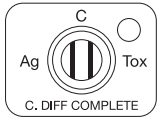


Figura 1e
Risultato non valido

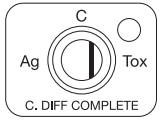


Figura 1f
Risultato non valido

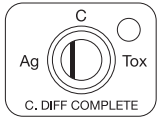


Figura 1g
Risultato non valido

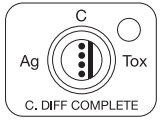


Figura 1h
Per l'interpretazione vedere il n,7

CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Interno: deve essere visibile una linea punteggiata blu al centro della *finestra di reazione*, sotto la "C" su ogni *dispositivo a membrana*sottoposto a test. La comparsa dei punti di controllo blu conferma che il campione e i reagenti sono stati dispensati correttamente, che i reagenti erano attivi al momento dell'esecuzione del dosaggio e che il campione è migrato correttamente attraverso il *dispositivo membrana*. Inoltre conferma la reattività degli altri reagenti associati al dosaggio. Uno sfondo chiaro nell'area dei risultati viene considerato come un controllo negativo interno. Se il test è stato eseguito correttamente e i reagenti funzionano a dovere, lo sfondo sarà bianco per consentire un risultato discernibile.
Esterno: la reattività del kit *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® deve essere verificata al ricevimento mediante il *controllo positivo* e il controllo negativo (*diluente*). Il *controllo positivo* viene fornito insieme al kit (flacone con il cappuccio grigio). Il *controllo positivo* conferma la reattività degli altri reagenti associati al dosaggio e non è concepito per garantire la precisione sul valore di cut-off del dosaggio analitico. Il *diluente* viene usato per il controllo negativo. È possibile eseguire altri test con controlli per soddisfare i requisiti delle disposizioni locali, statali e/o federali e/o delle organizzazioni accreditanti.

LIMITI

1. Il test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® viene usato per individuare l'antigene e le tossine C. difficile nei campioni fecali. Il test conferma la presenza di tossine nelle feci e queste informazioni devono essere tenute in debito conto dal medico alla luce dell'anamnesi clinica e dell'esame obiettivo del paziente. Il test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®rileva livelli di tossina A a ≥0,63 ng/mL, di tossina B a ≥0,16 ng/mL e di glutammato deidrogenasi a ≥0,8 ng/mL.
2. I campioni fecali sono estremamente complessi. I risultati ottimali con il test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® si ottengono con campioni non più vecchi di 24 ore. La maggior parte dei campioni non diluiti possono essere conservati a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C per 72 ore prima che si noti una degradazione significativa della tossina. Se i campioni non vengono testati entro questo periodo di tempo, possono essere congelati e scongelati. Tuttavia il ripetuto congelamento e scongelamento può comportare la perdita di immunoreattività dell'antigene e delle tossine A e B.
3. Alcuni campioni possono produrre reazioni deboli. Questa evenienza può essere dovuta a una serie di fattori come la presenza di bassi livelli di antigene e/o tossina, la presenza di sostanze leganti o enzimi inattivanti nelle feci. Le linee possono avere un'intensità da debole a scura. Questi campioni devono essere segnalati come positivi se si osserva qualsiasi linea blu, anche parziale. Una linea blu parziale evidente viene interpretata come un risultato positivo.
4. I campioni fecali conservati in formalina al 10%, mertiolato e formalina, formalina di sodio acetato o alcol polivinilico non possono essere utilizzati.
5. Il test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® è un test qualitativo. L'intensità del colore non deve essere interpretata in modo quantitativo.
6. Alcuni ceppi isolati di *C. sordellii* possono reagire nel test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® a causa della produzione di tossine immunologicamente correlate (1).
7. Tassi di colonizzazione fino al 50% sono stati riferiti nei lattanti. Un tasso elevato è stato riferito anche nei pazienti con fibrosi cistica (1,3). In questi gruppi i risultati possono sembrare positivi, ma devono considerati insieme alla possibilità di essere un vettore colonizzato.
8. L'unico organismo non-*C. difficile* a reagire nella porzione della tossina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® è stato il *Clostridium sordellii* VPI 9048. Questo ceppo produce tossine HT e LT, che sono rispettivamente omologhe alle tossine A e B.
9. Non esistono dati sull'effetto dei lavaggi del colon, degli enemi al bario, dei lassativi o delle preparazioni intestinali sulle prestazioni del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®. Tutte queste procedure possono causare un'estesa diluizione o la presenza di additivi che possono influenzare le prestazioni del test.

VALORI ATTESI

La malattia da *Clostridium difficile* è prevalentemente una malattia di tipo nosocomiale dei pazienti anziani e la frequenza dipende da fattori come la popolazione di pazienti, il tipo di istituto e l'epidemiologia. L'incidenza riferita di malattia da *C. difficile* nei pazienti con diarrea associata agli antibiotici può variare dal 5 % al 20% e gli ospedali possono sperimentare tassi inferiori o superiori a questo intervallo. È importante considerare tutti i risultati dei test tenendo conto dei sintomi clinici in quanto alcuni adulti sani e un numero elevato di lattanti sani (fino al 50%) risulteranno positivi alla tossina *C. difficile*. Inoltre, sono stati riferiti tassi di portatori di *C. difficile* tra il 22% e il 32% nei pazienti con fibrosi cistica (1,3). Negli studi condotti per questo dispositivo utilizzando pazienti sintomatici l'incidenza di tossine A e B è risultata pari al 12% e di GDH al 18%. Un risultato positivo nella porzione dell'antigene del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® conferma la presenza di *C. difficile* in un campione fecale; un risultato negativo indica l'assenza dell'organismo. Un risultato positivo nella porzione della tossina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® conferma la presenza di tossina di *C. difficile* in un campione fecale; un risultato negativo indica l'assenza dell'organismo o livelli di tossina insufficienti per essere rilevati.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Valutazione clinica della porzione dell'antigene del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

La porzione dell'antigene del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® è stata confrontata con la coltura batterica. I campioni inclusi nella valutazione sono stati inviati ai laboratori clinici per l'analisi di routine. La coltura batterica è stata eseguita in base alle procedure interne. I risultati sono presentati nella Tabella 1.

Tabella 1. Riepilogo delle prestazioni cliniche con confronto tra il test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® e la coltura batterica

n = 1126	Coltura batterica Positivo	Coltura batterica Negativo
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linea dell'antigene positiva	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linea dell'antigene negativa	21	842

		Limiti di confidenza 95%
Sensibilità	90,5%	85,7 – 93,9
Specificità	93,1%	91,2 – 94,7
Valore positivo predittivo	76,4%	70,7 – 81,3
Valore negativo predittivo	97,6%	96,2 – 98,4
Correlazione	92,6%	91,8 – 93,4

I campioni discrepanti sono stati valutati utilizzando gli attuali test ELISA per la glutammato deidrogenasi di *C. difficile*.
Ventinove dei 62 campioni falsamente positivi sono risultati positivi con un altro test GDH e sono stati considerati veri positivi.
Tredici dei 21 campioni falsamente negativi erano negativi con un altro test GDH e sono stati considerati veri negativi.

La porzione di antigene del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® è stata confrontata con il test di coltura tissutale per il rilevamento della tossina di C. difficile. I campioni inclusi nella valutazione sono stati inviati ai laboratori clinici per l'analisi di routine. I risultati sono presentati nella Tabella 2. La porzione di antigene del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® ha rilevato il 98,7% dei campioni positivi alla coltura tissutale.

Tabella 2. Riepilogo delle prestazioni cliniche con confronto tra il test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® e il test di coltura tissutale

n = 1126	Coltura tissutale Positivo	Coltura tissutale Negativo
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linea dell'antigene positiva	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linea dell'antigene negativa	2	861

Valutazione clinica della porzione della tossina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

La porzione della tossina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® è stata confrontata con il test di coltura tissutale presso due laboratori clinici e internamente presso TECHLAB®, Inc. I campioni inclusi nella valutazione sono stati inviati ai laboratori clinici per l'analisi di routine. I risultati sono presentati nella Tabella 3.

Tabella 3. Riepilogo delle prestazioni cliniche con confronto tra il test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® e il test di coltura tissutale

n = 1126	Coltura tissutale Positivo	Coltura tissutale Negativo
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linea delle tossine positiva	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linea delle tossine negativa	19	964

		Limiti di confidenza 95%
Sensibilità	87,8%	81,4 - 92,3
Specificità	99,4%	98,6 - 99,7
Valore positivo predittivo	95,8%	90,7 - 98,3
Valore negativo predittivo	98,1%	96,9 - 98,8
Correlazione	97,8%	97,6 - 98,0

I campioni discrepanti sono stati valutati utilizzando test ELISA per le tossine A e B.
Cinque dei 6 campioni falsamente positivi sono risultati positivi al test ELISA e sono stati considerati veri positivi.
Dodici dei 19 campioni falsamente negativi erano negativi al test ELISA e sono stati considerati veri negativi.

EFFETTO DELLA CONSISTENZA DEI CAMPIONI DI FECI

Effetto della consistenza dei campioni di feci sul test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

La reazione dei campioni di feci di diversa consistenza nella porzione dell'antigene (n=978) e nella porzione della tossina (n=981) del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* è presentata nelle Tabelle 4 e 5. Le percentuali di reazioni positive utilizzando la coltura o il test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* sono risultate simili in tutti e tre i tipi di campioni fecali (liquidi, semi-solidi e solidi). Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi del C. difficile. Alla base dell'analisi vi era l'anamnesi clinica del paziente e non la consistenza del campione. Nella porzione dell'antigene, i risultati mostrano che il test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* dava risultati analoghi alla coltura batterica quando veniva eseguita l'analisi di consistenze diverse. Nella porzione della tossina, i risultati mostrano che il test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* dava risultati analoghi alla coltura tissutale quando veniva eseguita l'analisi di consistenze diverse.

Tabella 4. Reazione dei campioni di feci di diversa consistenza nella porzione dell'antigene del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

Numero di campioni (n = 978)	Campioni liquidi (n = 335)	Semi-solidi Campioni (n = 522)	Campioni solidi (n = 121)
Positivi alla coltura batterica	59 (17,6%)	110 (21,1%)	19 (15,7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linea dell'antigene positiva	72 (21,5%)	128 (24,5%)	25 (20,7%)
Negativi alla coltura batterica	276 (82,4%)	412 (78,9%)	102 (84,3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linea dell'antigene negativa	263 (78,5%)	394 (75,5%)	96 (79,3%)

Tabella 5. Reazione dei campioni di feci di diversa consistenza nella porzione della tossina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

Numero di campioni (n = 981)	Campioni liquidi (n = 336)	Semi-solidi Campioni (n = 523)	Campioni solidi (n = 122)
Positivi alla coltura tissutale	43 (12,8%)	81 (15,5%)	8 (6,6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linea delle tossine positiva	42 (12,5%)	72 (13,8%)	7 (5,7%)
Negativi alla coltura tissutale	293 (87,2%)	442 (84,5%)	114 (93,4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linea delle tossine negativa	294 (87,5%)	451 (86,2%)	115 (94,3%)

SENSIBILITA' ANALITICA

Il valore di cut-off del test è stato stabilito a concentrazioni di 0,63 ng/mL per la tossina A, 0,16 ng/mL per la tossina B e 0,8 ng/mL per la glutammato deidrogenasi.

RIPRODUCIBILITÀ

La riproducibilità del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* è stata determinata utilizzando 12 campioni fecali codificati in modo da prevenirne l'identificazione durante il test. Il test è stato eseguito presso 3 laboratori indipendenti che hanno analizzato i campioni per 3 giorni. I campioni hanno prodotto i risultati attesi il 100% delle volte.

CROSS-REATTIVITA'

I campioni fecali inoculati con i seguenti microorganismi fino a una concentrazione finale di circa 10^8 o più organismi per mL non hanno reagito nella porzione dell'antigene o della tossina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*:

Batterio o patogeno: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (non tossigeno)*, Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC*, Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7*, Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans)*, Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

L'unico organismo non-*C. difficile* a reagire nella porzione della tossina del test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* è stato il *Clostridium sordellii* VPI 9048. Questo ceppo produce tossine HT e LT, che sono rispettivamente omologhe alle tossine A e B.

I seguenti virus da $10^{3,3}$ a $10^{8,25}$ unità TCID per 0,2 mL non hanno reagito nel test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*:

Virus: Tipi di adenovirus 1, 2, 3, 5, 40, 41, coronavirus umano, coxsackievirus B2, B3, B4, B5, echovirus 9, 11, 18, 22, 33, tipo di enterovirus 68, 69, 70, 71, rotavirus.

SOSTANZE INTERFERENTI

Le seguenti sostanze (formulazione USA) non hanno avuto effetti sui risultati del test quanto presenti nelle feci alle concentrazioni indicate: mucina (3,5% p/v), sangue umano (40% v/v), solfato di bario (5% p/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), acido stearico/palmitico (40% p/v), metronidazolo (0,25% p/v), vancomicina (0,25% p/v).

REAZIONE DEGLI ISOLATI CLINICI OTTENUTI ALL'AGAR CICLOSERINA-CEFOXITINA-FRUTTOSIO (CCFA)

Un totale di 103 isolati clinici di *C. difficile*, ottenuti mediante coltura batterica anaerobica su CCFA dopo 3 giorni a 37°C sono stati sottoposti ad analisi con test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Ai fini dell'analisi, singole colonie sono state selezionate e sospese nel *diluente* come raccomandato per i campioni fecali. Tutti e 103 gli isolati hanno prodotto una reazione positiva all'antigene nel test. Settanta dei 103 isolati (68%) provenivano da campioni fecali positivi per la tossina di *C. difficile* mediante coltura tissutale. Di questi, 56 (80%) hanno prodotto una reazione positiva alla tossina quando sottoposti a screening dopo crescita anaerobica su CCFA per 3 giorni a 37°C.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

BEOOGD GEBRUIK

De TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-test is een snel membraan-enzymimmuno-assay voor de gelijktijdige detectie van *Clostridium difficile*-glutamaatdehydrogenase-antigen en de toxinen A en B in een enkel reactieputje. De test detecteert *C. difficile*-antigen, glutamaatdehydrogenase, als een screening voor de aanwezigheid van *C. difficile* en bevestigt de aanwezigheid van toxigeen *C. difficile* door detectie van de toxinen A en B in fecale monsters van personen die vermoedelijk lijden aan een *C. difficile*-aandoening. De test moet worden gebruikt als hulp bij de diagnose van een *C. difficile*-aandoening. Net als bij andere *C. difficile*-testen, moeten de resultaten worden beschouwd in combinatie met de voorgeschiedenis van de patiënt.

UITLEG

Na behandeling met antibiotica ontwikkelen veel patiënten gastro-intestinale problemen die gaan van milde diarree tot ernstige pseudomembraneuze colitis. Veel gevallen van de mildere vormen van een maagdarmstelselaandoening en de meeste gevallen van pseudomembraneuze colitis worden veroorzaakt door toxigene stammen van *Clostridium difficile* (1). Dit organisme is een opportunistische anaerobe bacterie die in de darm groeit zodra de normale flora door het antibioticum is veranderd. Toxigene stammen van *C. difficile* dragen de genen die coderen voor de toxinen terwijl niet-toxigene stammen deze toxinegenen niet dragen. Het begin van de aandoening wordt geassocieerd met de toxinen die door het toxigene organisme zijn geproduceerd. De klinische klachten geassocieerd met de aandoening worden geacht primair te wijten te zijn aan toxine A, dat een weefselbeschadigend enterotoxine is (2,3). *C. difficile* produceert ook een tweede toxine, het zogenaamde toxine B. Toxine B, dat ook het cytotoxine van het organisme wordt genoemd, is het toxine dat gedetecteerd wordt door het weefselkweekassay dat momenteel door veel laboratoria wordt gebruikt. Toxigene *C. difficile*-stammen produceren beide toxinen, of alleen toxine B (4-7). De glutamaatdehydrogenase van *C. difficile* is een goede antigenmerker voor het organisme in feces omdat dit door alle stammen, toxigeen of niet-toxigeen in grote hoeveelheden geproduceerd wordt (8-10). Het antigen kan in fecale monsters worden gedetecteerd door gebruik te maken van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-test. Een positief resultaat van de test voor het glutamaatdehydrogenase van *C. difficile* bevestigt de aanwezigheid van dit organisme in een fecaal monster; een negatief resultaat duidt op de afwezigheid van het organisme. Een positief resultaat op de test voor de toxinen A en B bevestigt de aanwezigheid van het toxigene *C. difficile*.

PRINCIPE VAN DE TEST

De *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-test gebruikt antilichamen specifiek voor glutamaatdehydrogenase en de toxinen A en B van *C. difficile*. Het instrument bevat een reactievenster met drie verticale lijnen geïmmobiliseerde antilichamen. De antigentestlijn ("Ag") bevat antilichamen tegen *C. difficile*-glutamaatdehydrogenase. De controlelijn ("C") is een stippellijn die anti-mierikswortelperoxidase (HRP)-antilichamen bevat. De testlijn voor de toxinen A en B ("Tox") bevat antilichamen tegen de *C. difficile*-toxinen A en B. Het *conjugaat* bestaat uit antilichamen van glutamaatdehydrogenase en antilichamen van de toxinen A en B gekoppeld aan mierikswortelperoxidase. Om de test uit te voeren, wordt het monster toegevoegd aan een buis die een mengsel van *verdunner* en *conjugaat* bevat. Het verdunde monster-conjugaatmengsel wordt aangebracht in het *monsterputje* en het instrument wordt 15 minuten op kamertemperatuur geïncubeerd. Tijdens de incubatie binden eventuele glutamaatdehydrogenase en toxinen A en B in het monster aan de antilichaam-peroxidaseconjugaten. De antigen-antilichaam-conjugaatcomplexen migreren door een filterkussentje naar een membraan waar zij worden ingevangen door de geïmmobiliseerde glutamaatdehydrogenasespecifieke en toxine-A- en -B-specifieke antilichamen in de lijnen. Het *reactievenster* wordt vervolgens gewassen met *wasbuffer*, gevolgd door toevoeging van*substraat*. Na een 10 minuten durende incubatieperiode, wordt de "Ag"-reactie visueel onderzocht op de verschijning van een verticale blauwe lijn aan de "Ag"-zijde van het *reactievenster*. Een blauwe lijn geeft een positieve test aan. Als de "Ag" positief is, moet de "Tox"-reactie visueel worden onderzocht op de verschijning van een blauwe lijn aan de "Tox"-zijde van het *reactievenster*. Een blauwe lijn geeft een positieve test aan. Een positieve "C"-reactie, aangegeven door een verticale gestippelde blauwe lijn onder het "C"-gedeelte van het *reactievenster*, bevestigt dat de test goed werkt en de resultaten geldig zijn.

VERSTREKTE MATERIALEN

MEM | DEV — ***Membraaninstrumenten*** – elk zakje bevat 1 instrument

DIL | SPE — ***Verdunner* (22 mL per fles)** – Gebufferde eiwitoplossing met gegradueerde druppelaarconstructie (bevat 0,05% ProClin® 300)*

WASH | REAG — ***Wasbuffer* (12 mL per fles)** – Gebufferde oplossing met gegradueerde druppelaar constructie (bevat 0,05% ProClin® 300)*

SUBS | REAG — ***Substraat* (3,5 mL per fles)** – Oplossing die tetramethylbenzidine bevat

CONJ | ENZ — ***Conjugaat* (2,5 mL per fles)** – Monoklonaal antilichaam van de muis specifiek voor glutamaatdehydrogenase gekoppeld aan mierikswortelperoxidase en polyklonale antilichamen van de geit specifiek voor de toxinen A en B gekoppeld aan mierikswortelperoxidase in een gebufferde eiwitoplossing (bevat 0,05% ProClin® 300)*

CONTROL | + — ***Positieve controle* (2 mL)** – Antigen in een gebufferde eiwitoplossing

Plastic wegwerpoverbrengpipettes – gegradueerd op 25 µL, 400 µL en 500 µL

IVD — Voor *in vitro* diagnostisch gebruik

*Signaalwoord: Waarschuwing
H317: Kan een allergische huidreactie veroorzaken
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

MATERIALEN EN VEREISTE, MAAR NIET MEEGELEVERDE UITRUSTING

Kleine testbuizen (bijv. plastic eppendorfbuizen of glazen buizen)
Applicatorsticks *Timer* *Vortexmixer*
Wegwerphandschoenen voor hantering van fecale monsters *Pipetten en punten*

HOUDBAARHEIDSPERIODE EN OPSLAG

De vervaldatum van de set staat op het label. Vervaldatums voor elke component staan op de individuele labels. De set moet worden opgeslagen tussen 2 °C en 8 °C.

VOORZORGSMAATREGELEN

1. Reagentia uit verschillende sets mogen niet worden gemengd of onderling uitgewisseld. Gebruik geen set na de vervaldatum.
2. Elke component in de set moet worden geïnspecteerd op mogelijke tekenen van lekkage. Inspecteer de set bij aankomst, om te verzekeren dat de componenten niet zijn bevroren of warm zijn bij aanraking door onjuiste verzendomstandigheden.
3. Breng alle componenten op KAMERTEMPERATUUR VOOR HET GEBRUIK!
4. Doppen, punten en druppelaarconstructies zijn kleurgecodeerd; NIET mengen of onderling uitwisselen!
5. Bevries de reagentia niet. De set moet worden opgeslagen tussen 2 °C en 8 °C.
6. Het zakje dat het *membraaninstrument* bevat, moet op kamertemperatuur zijn voordat het wordt geopend. Houd de membraaninstrumenten droog voor het gebruik.

NL

7. Gebruik fecale monsters binnen 72 uur na verzameling om optimale resultaten te verkrijgen. Monsters die zijn bevroren, kunnen door bevriezen en dooien hun activiteit verliezen. Als er bevroren monsters worden gebruikt, moeten deze op kamertemperatuur worden ontdooid.
8. Houd de reagensflessen verticaal om reagentia toe te dienen, om een consistente druppelgrootte en correct volume te verzekeren.
9. Monsters en membraaninstrumenten moeten na het gebruik worden gehanteerd en afgevoerd als potentiële biologische gevaren.
10. Membraaninstrumenten kunnen niet worden hergebruikt.
11. De test is geoptimaliseerd op gevoeligheid en specificiteit. Veranderingen van de gespecificeerde procedure en/of testcondities kunnen de gevoeligheid en specificiteit van de test beïnvloeden. Wijk niet af van de gespecificeerde procedure.
12. Let op de totale assayperiode wanneer u meer dan een fecaal monster test. Doe er eerst *verdunner* in en voeg dan het *conjugaat* toe aan elke buis *verdunner*. Vervolgens voegt u het monster toe aan de buis *verdunner/conjugaat*. Meng alle verdunde monsters grondig en breng ze over op het *membraaninstrument*. De incubatiestap van 15 minuten begint nadat het laatste verdunde monster-conjugaatmengsel werd overgebracht op het laatste *membraaninstrument*.
13. Als het *substraat*reagens verandert in een donkerblauwe/violette kleur, belt u de technische diensten om vervanging.
14. Fecale monsters kunnen potentieel infectieuze agentia bevatten en moeten worden gehanteerd op “bioveiligheidsniveau 2” zoals aanbevolen in de CDC/NIH-handleiding “Biologische veiligheid in microbiologische en biomedische laboratoria”.
15. Alle reagentia zijn alleen voor *in vitro* diagnostisch gebruik.
16. Draag wegwerphandschoenen wanneer u de test doet.
17. De reagentia bevatten 0,05% van het conserveringsmiddel ProClin® 300. De concentratie is weliswaar laag, maar ProClin® 300 staat bekend als schadelijk. Als er huidirritatie of huiduitslag optreedt, vraag dan medisch advies/medische hulp. Doe vervuilde kleding uit en was deze, voordat u ze opnieuw gebruikt. Hanteer de reagentia in overeenstemming met de bestaande regelgeving voor laboratoriumveiligheid en goede laboratoriumpraktijken. Op aanvraag zijn veiligheidsinformatiebladen voor dit product verkrijgbaar, neem contact op met de technische ondersteuning.
18. Volg daarom uw nationale, regionale en lokale verordeningen voor afvalverwijderingsregelgeving.

VERZAMELING, HANTERING EN OPSLAG VAN FECALE MONSTERS

Aanvaardbare monstertypen
Verse fecale monsters
Bevroren fecale monsters
Monsters in transportmedia (Cary Blair, C&S)

Niet gebruiken
Fecale monsters in op formaline gebaseerde fixatief (bijv. natriumacetaatformaline, 10% formaline, merthiolaatformaline)
Fecale monsters in op alcohol gebaseerde fixatief (bijv. polyvinylalcohol)

Opslag monsters Temperatuur	Aanvaardbare opslagduur	Opmerkingen
2 °C – 8 °C	72 uur	Ideale monsters zijn minder dan 24 uur oud
Bevroren ≤ -10 °C	Langer dan 72 uur	Ontdooien op kamertemperatuur. Verscheidene keren bevriezen en ontdooien kan leiden tot verlies van monsteractiviteit door toxine-afbraak.

1. De ter plaatse gebruikte standaard verzamelings- en hanteringsprocedures voor fecale monsters zijn toepasselijk.
2. Fecale monsters moeten worden verzameld in schone, lekvrije containers.
3. Opslag van fecale monsters in de *verdunner* wordt NIET aanbevolen.
4. Laat de fecale monsters niet >24 uur in het *verdunner/conjugaat*-mengsel zitten.

BEREIDING MONSTER

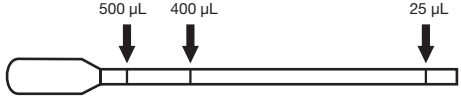
1. Breng alle reagentia en het vereiste aantal apparaten voor het gebruik op kamertemperatuur. Aanbevolen wordt de reagentia uit het schuimverpakkingsstuk te verwijderen om de tijd die nodig is om ze tot kamertemperatuur op te warmen te verkorten.
2. Stel voor elk monster een kleine testbuis op en label deze, en doe hetzelfde voor optionele externe controles, voor zover noodzakelijk.
3. Gebruik de zwart gegradueerde druppelaarconstructie, voeg 750 µL (2e graduatie vanaf de punt) *verdunner* toe aan elke buis voor fecale monsters. **Voor monsters in transportmedia zoals Cary Blair of C&S, voegt u 650 µL (1e maatstreep vanaf de punt) *verdunner* toe aan de buis.**

Monstertype	Volume *verdunner*
Verse fecale monsters	750 µL (2e graduatie vanaf de punt)
Bevroren fecale monsters (bevroren onverdund)	750 µL (2e graduatie vanaf de punt)
Monsters in transportmedia (Cary Blair, C&S)	650 µL (1e maatstreep vanaf de punt)
Externe controles (positief en negatief)	750 µL (2e graduatie vanaf de punt)



4. Voeg een druppel *conjugaat* (fles met de rode dop) toe aan elke buis.
5. Zorg voor een plastic wegwerpoverbrengpipet (meegeleverd met de set) voor elk monster – de pipetten hebben oplopende graduaties van 25 µL, 400 µL en 500 µL.

Gegradueerde overbrengpipet:



6. **Meng alle monsters grondig ongeacht de consistentie – het is van essentieel belang dat de monsters gelijkmatig zijn gesuspendeerd voordat ze worden overgebracht.**
   Vloeibare/halfvaste monsters – pipet 25 µL van monster met een overbrengpipet en dispenderen in het *verdunner/conjugaat*-mengsel. Gebruik dezelfde overbrengpipet om het verdunde monster te mengen.
   Gevormde/vaste monsters – Zorg ervoor dat de correcte hoeveelheid gevormde feces aan het monstermengsel wordt toegevoegd. Meng het monster grondig met behulp van een houten applicatorstick en breng een klein gedeelte (ongeveer 2 mm diameter, het equivalent van 25 µL) van het monster over in het verdunner/conjugaat-mengsel. Emulsifeer het monster met behulp van de applicatorstick.

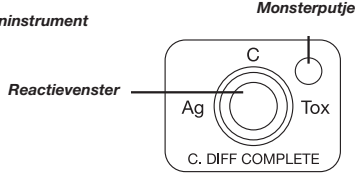
Fecale monsters in Cary Blair- of C&S-transportmedia - pipet 100 µL (2 druppels uit overbrengpipet) van het monster in het *verdunner/conjugaat*-mengsel.

7. **Optionele externe controlemonsters:**
   Externe positieve controle - voeg een druppel *positieve controle* (fles met grijze dop) in het *verdunner/conjugaat*-mengsel.
   Externe negatieve controle - voeg 25 µL *verdunner* in het *verdunner/conjugaat*-mengsel.

OPMERKING: Overbrenging van te weinig monster, of als het niet volkomen gemixt is en het monster niet compleet gesuspendeerd is in het verdunner/conjugaat-mengsel, kan leiden tot een fout-negatief testresultaat. De toevoeging van te veel fecaal monster kan leiden tot ongeldige resultaten vanwege een beperkte monsterstroom.

TESTPROCEDURE

1. Zorg voor één *membraaninstrument* per monster en één instrument per optionele externe positieve of negatieve controle, voor zover noodzakelijk. De foliezakken die de instrumenten bevatten moeten op kamertemperatuur worden gebracht, voordat ze worden geopend. Gebruik het instrument onmiddellijk na openen. Etiketteer elk instrument op de juiste wijze en zet dit op een vlak oppervlak zodat de opdruk “C. DIFF COMPLETE” aan de onderkant van het instrument zit en het monsterputje zich in de rechterbovenhoek van het instrument bevindt.

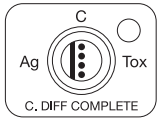


2. Sluit elke buis verdund monster en meng grondig. De juiste menging kan worden bereikt door de inhoud te laten wervelen of de buis om te keren. Als een patiëntmonster of *positieve controle* is verdund in het *verdunner/conjugaat*-mengsel, kan het gedurende een periode van maximaal 24 uur op kamertemperatuur worden geïncubeerd voordat het op het *membraaninstrument* wordt aangebracht.
3. Gebruik een nieuw overbrengpipet, breng 500 µL van het verdunde monsterconjugaatmengsel in het ***monsterputje*** (kleinere opening in de rechterbovenhoek van het instrument) van een *membraaninstrument*, zorg ervoor dat u het vloeistofmonster eruit perst op het gaasje in het *membraaninstrument*. Wanneer u het monster in het monsterputje aanbrengt, dient u zich ervan te vergewissen dat de punt van de overbrengpipet naar het *reactievenster* is gebogen (grotere opening in het midden van het instrument).
4. Incubeer het instrument gedurende 15 minuten op kamertemperatuur – het monster zal door het instrument kruipen waarbij zich een nat gedeelte over het *reactievenster* verspreidt.
   OPMERKING OVER MONSTERS DIE NIET MIGREREN:
   Zo nu en dan zal een verdund monster niet goed migreren en wordt het reactievenster niet volledig nat. Als het reactievenster niet binnen 5 minuten nadat het monster op het monsterputje is aangebracht volkomen nat lijkt, voeg dan 100 µL (4 druppels) verdunner toe op het monsterputje en wacht nog eens 5 minuten (in totaal 20 minuten).
5. Na de incubatie, voegt u 300 µL *wasbuffer* toe aan het ***reactievenster***, gebruik daarbij de gegradueerde witte druppelaarconstructie. Laat de *wasbuffer* door het reactievenstermembraan lopen en volkomen absorberen.
6. Voeg 2 druppels *substraat* toe (fles met witte dop) aan het ***reactievenster***. Lees de resultaten visueel af na 10 minuten en registreer ze.

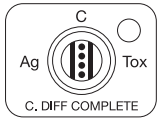
INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

1. De interpretatie van de test is het betrouwbaarst wanneer het instrument onmiddellijk aan het eind van de 10 minuten durende reactieperiode wordt afgelezen. Lees het instrument op een normale werkafstand af in een goed verlichte ruimte. Kijk met de gezichtslijn direct over het instrument.
2. Observeer het instrument op de verschijning van blauwe stippen in het midden van het *reactievenster* die de interne positieve controle voorstellen. De verschijning van eventuele controlestip(pen) stelt een geldige interne controle voor. De achtergrond kan wit tot lichtblauw gekleurd lijken. Observeer het instrument op de verschijning van blauwe lijnen aan de “Ag”- en “Tox”- zijden van het *reactievenster* die testlijnen voorstellen. De lijnen kunnen een zwakke tot donkere intensiteit hebben.
3. **Positief antigen (“Ag”)-resultaat:** Een positief antigenresultaat kan op elk tijdstip tussen de toevoeging van *substraat* en de leestijd van 10 minuten worden geïnterpreteerd. Voor een positief antigenresultaat zijn de blauwe “Ag”-lijn en de gestippelde blauwe controlelijn onder “C” zichtbaar (afbeelding 1a). De lijnen kunnen een zwakke tot donkere intensiteit hebben. Een duidelijke gedeeltelijke lijn wordt geïnterpreteerd als een positief resultaat. Interpreteer de membraanverkleuring niet als een positief resultaat. Een positief resultaat duidt op de aanwezigheid van *C. difficile*.
4. **Positief antigen- en toxine (“Tox”)-resultaat:** Als het antigenresultaat positief is (d.w.z. er zijn een blauwe “Ag”-lijn en een gestippelde blauwe controle onder “C” zichtbaar), gaat u verder met de interpretatie van het toxineresultaat. Een positief toxineresultaat kan op elk tijdstip tussen de toevoeging van *substraat* en de leestijd van 10 minuten worden geïnterpreteerd. Voor een positief toxineresultaat is er blauwe “Tox”-lijn zichtbaar (afbeelding 1b). De lijn kan een zwakke tot donkere intensiteit hebben. Een duidelijke gedeeltelijke lijn wordt geïnterpreteerd als een positief resultaat. Interpreteer de membraanverkleuring niet als een positief resultaat. Een positief resultaat duidt op de aanwezigheid van het *C. difficile*-toxine.
5. **Negatief resultaat:** Een test kan voor afloop van de 10 minuten volgend op de toevoeging van het *substraat* niet worden geïnterpreteerd als negatief of ongeldig. Er is een enkele blauwe stippellijn zichtbaar in het midden van het *reactievenster* onder de “C” en er zijn geen testlijnen zichtbaar aan de “Ag”-kant of de “Tox”-kant van het *reactievenster* (afbeelding 1c). Een negatief resultaat in het antigengedeelte geeft aan dat het *C. difficile*-antigen ofwel afwezig is in het monster of onder de detectiegrens van de test ligt. Een negatief resultaat in het toxinegedeelte geeft aan dat het C. difficile-toxine ofwel afwezig is in het monster of onder de detectiegrens van de test ligt.
6. **Ongeldig resultaat:** Er zijn geen lijnen zichtbaar in het reactievenster (afbeelding 1d). Het testresultaat is ongeldig als er bij afronding van de reactieperiode geen blauwe stippellijn aanwezig is onder de “C” (afbeeldingen 1e, 1f, 1g).
7. **Negatief antigen (“Ag”), positief toxine (“Tox”):** Een laag percentage van de monsters kan negatief testen voor antigen maar positief voor toxine. Deze monsters moeten als onduidelijk worden beschouwd en opnieuw worden getest met behulp van een vers monster (afbeelding 1h). Als het monster bij de volgende test negatief is voor antigen maar positief voor toxine, meldt u een positief toxineresultaat.

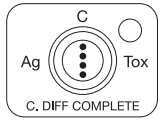
AFBEELDING 1: *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN



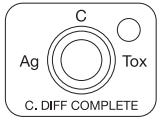
Afbeelding 1a
Positief antigenresultaat



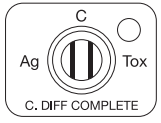
Afbeelding 1b
Positief antigen
- en toxineresultaat



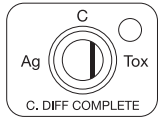
Afbeelding 1c
Negatief resultaat



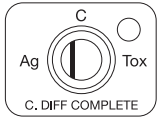
Afbeelding 1d
Ongeldig resultaat



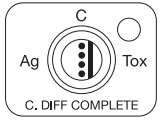
Afbeelding 1e
Ongeldig resultaat



Afbeelding 1f
Ongeldig resultaat



Afbeelding 1g
Ongeldig resultaat



Afbeelding 1h
Zie nr. 7 voor de interpretatie

KWALITEITSCONTROLE

Intern: Er moet een gestippelde blauwe lijn zichtbaar zijn in het midden van het *reactievenster*, onder de "C" op elk *membraaninstrument* dat is getest. De verschijning van de blauwe controlestippen bevestigt dat het monster en de reagentia correct werden toegevoegd, dat de reagentia actief waren op het tijdstip waarop het assay werd uitgevoerd en dat het monster goed door het *membraaninstrument* migreerde. Deze bevestigt ook de reactiviteit van de andere reagentia in verband met het assay. Een heldere achtergrond in het resultaatgedeelte wordt beschouwd als een interne negatieve controle. Als de test correct werd uitgevoerd en de reagentia goed werken, zal de achtergrond wit zijn om een waarneembaar resultaat te geven.

Extern: De reactiviteit van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-set moet na ontvangst met behulp van de *positieve controle* en negatieve controle (*verdunner*) worden geverifieerd. De *positieve controle* wordt met de set meegeleverd (fles met grijze dop). De *positieve controle* bevestigt de reactiviteit van de andere reagentia in verband met het assay, en is niet bedoeld om de precisie op de scheidslijn van het analytische assay te verzekeren. De *verdunner* wordt gebruikt voor de negatieve controle. Er kunnen extra testen worden uitgevoerd met de controles om tegemoet te komen aan de eisen van plaatselijke, nationale en/of federale regelgevingen en/of accrediterende organisaties.

BEPERKINGEN

1. De *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test wordt gebruikt om C. difficile-antigen en toxine(n) te detecteren in fecale monsters. De test bevestigt de aanwezigheid van toxine in feces en deze informatie moet door de arts in overweging worden genomen in het licht van de klinische geschiedenis en het lichamelijke onderzoek van de patiënt. De *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test detecteert toxine A-niveaus ≥0,63 ng/mL, toxine B-niveaus ≥0,16 ng/mL en glutamaatdehydrogenase-niveaus ≥0,8 ng/mL.
2. Fecale monsters zijn buitengewoon complex. Optimale resultaten met de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test worden verkregen met monsters die minder dan 24 uur oud zijn. De meeste onverdunde monsters kunnen 72 uur worden bewaard tussen 2 °C en 8 °C voordat er een significante afbraak van het toxine wordt bemerkt. Als monsters niet binnen deze periode worden geanalyseerd, kunnen zij bevroren en ontdooid worden. Herhaaldelijk bevriezen en ontdooien kan echter leiden tot verlies in de immunoreactiviteit van het antigen en toxine A en B.
3. Sommige monsters kunnen zwakke reacties geven. Dit kan te wijten zijn aan een aantal factoren zoals de aanwezigheid van lage niveaus antigen en/of toxine, de aanwezigheid van bindende stoffen, of inactiverende enzymen in de feces. De lijnen kunnen een zwakke tot donkere intensiteit hebben. Deze monsters kunnen worden gerapporteerd als positief als er een blauwe lijn, zelfs een gedeeltelijke lijn, wordt waargenomen. Een duidelijke gedeeltelijke blauwe lijn wordt als een positief resultaat geïnterpreteerd.
4. Fecale monsters bewaard in 10% formaline, merthiolaatformaline, natriumacetaatformaline, of polyvinylalcohol kunnen niet worden gebruikt.
5. De *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test is kwalitatief. De intensiteit van de kleur mag niet kwantitatief worden geïnterpreteerd.
6. Sommige isolaten van *C. sordellii* kunnen in de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test reageren door de productie van immunologisch verwante toxinen (1).
7. Kolonisatiepercentages tot 50% zijn gemeld voor zuigelingen. Een hoog percentage werd ook gemeld bij cystische-fibrosepatiënten (1,3). De resultaten kunnen in deze groepen positief lijken, maar moeten worden gezien in combinatie met de mogelijkheid een gekolonialiseerde drager te zijn.
8. Het enige niet-*C. difficile*-organisme dat reageert op het toxinegedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test was *Clostridium sordellii* VPI 9048. Deze stam produceert de toxinen HT en LT, die homoloog zijn aan de toxinen A, respectievelijk B.
9. Er bestaan geen gegevens over de effecten van wassingen van de dikke darm, bariumklysma's, laxeermiddelen of darmpreparaten op de prestatie van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test. Al deze procedures kunnen leiden tot uitgebreide verdunning of aanwezigheid van additieven die de testprestatie kunnen beïnvloeden.

VERWACHTE WAARDEN

Een *Clostridium difficile*-aandoening is primair een nosocomiale aandoening van oudere patiënten en de frequentie van de aandoening is afhankelijk van factoren zoals patiëntenpopulatie, type instelling en epidemiologie. De gerapporteerde incidentie van de *C. difficile*-aandoening bij patiënten met antibioticumgerelateerde diarree kunnen lopen van 5 tot 20%, en ziekenhuizen kunnen percentages ervaren die lager of hoger zijn dan dit bereik. Het is belangrijk eventuele testresultaten te beschouwen in combinatie met klinische verschijnselen, omdat sommige gezonde volwassenen en grote aantallen gezonde zuigelingen (tot 50%) positief zijn voor het *C. difficile*-toxine. Bovendien zijn voor *C. difficile* dragerpercentages van 22% tot 32% gerapporteerd bij cystische-fibrosepatiënten (1,3). In de onderzoeken die voor dit instrument zijn uitgevoerd met symptomatische patiënten, was de incidentie van de toxinen A en B 12% en GDH 18%. Een positief resultaat in het antigengedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test bevestigt de aanwezigheid van *C. difficile* in een fecaal monster; een negatief resultaat duidt op de afwezigheid van het organisme. Een positief resultaat in het toxinegedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® bevestigt de aanwezigheid van het *C. difficile*-toxine in een fecaal monster; een negatief resultaat duidt op de afwezigheid van toxine of te lage toxineniveaus voor detectie.

PRESTATIEKARAKTERISTIEKEN

Klinische evaluatie van het antigengedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test

Het antigengedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test werd vergeleken met bacteriekweek. Monsters die zijn opgenomen in de evaluatie werden voor routinematig testen voorgelegd aan klinische laboratoria. De bacteriekweektest werd uitgevoerd overeenkomstig de eigen laboratoriumprocedures. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1. Samenvatting van de klinische prestatie van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test vergeleken met bacteriekweek

n = 1126	Bacteriekweek Positief	Bacteriekweek Negatief
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlijn positief	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlijn negatief	21	842

		95% betrouwbaar-heidsinterval
Gevoeligheid	90,5%	85,7 – 93,9
Specificiteit	93,1%	91,2 – 94,7
Voorspellende positieve waarde	76,4%	70,7 – 81,3
Voorspellende negatieve waarde	97,6%	96,2 – 98,4
Correlatie	92,6%	91,8 – 93,4

Tegenstrijdige monsters werden geëvalueerd met behulp van actuele ELISA-testen voor *C. difficile*-glutamaatdehydrogenase.
Negenentwintig van de 62 fout-positieve monsters waren positief bij een andere GDH-test en werden als echt-positief beschouwd.
Dertien van de 21 fout-negatieve monsters waren negatief bij een andere GDH-test en werden als echt-negatief beschouwd.

Het antigengedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test werd vergeleken met het weefselkweek-assay voor de detectie van C. difficile-toxine. Monsters die zijn opgenomen in de evaluatie werden voor routinematig testen voorgelegd aan klinische laboratoria. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 2. Het antigengedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test detecteerde 98,7% van de weefselkweek-positieve monsters.

Tabel 2. Samenvatting van klinische prestatie, vergelijking van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test met het weefselkweek-assay

n = 1126	Weefselkweek Positief	Weefselkweek Negatief
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlijn positief	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlijn negatief	2	861

Klinische evaluatie van het toxinegedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test

Het toxinegedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test werd vergeleken met het weefselkweek-assay in twee klinische laboratoria en binnen het bedrijf TECHLAB®, Inc. Monsters die zijn opgenomen in de evaluatie werden voor routinematig testen voorgelegd aan de klinische laboratoria. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3. Samenvatting van de klinische prestatie, vergelijking van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test met weefselkweek-assay

n = 1126	Weefselkweek Positief	Weefselkweek Negatief
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxinelijn positief	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxinelijn negatief	19	964

		95% betrouwbaar-heidsinterval
Gevoeligheid	87,8%	81,4 - 92,3
Specificiteit	99,4%	98,6 - 99,7
Voorspellende positieve waarde	95,8%	90,7 - 98,3
Voorspellende negatieve waarde	98,1%	96,9 - 98,8
Correlatie	97,8%	97,6 - 98,0

Tegenstrijdige monsters werden geëvalueerd met behulp van actuele ELISA-testen voor toxine A en B.
Vijf van de 6 fout-positieve monsters waren positief bij ELISA en werden als echt positief beschouwd.
Twaalf van de 19 fout-negatieve monsters waren negatief bij ELISA en werden als echt-negatief beschouwd.

EFFECT VAN FECALE MONSTERCONSISTENTIE

Effect van de fecale monsterconsistentie op de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test

De reactie van fecale monsters van variërende consistentie in het antigengedeelte (n=978) en toxinegedeelte (n=981) van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test wordt weergegeven in de tabellen 4 en 5. De percentages positieve reacties met behulp van ofwel een kweek-assay of de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test waren gelijksoortig bij alle drie typen fecale monsters (vloeibaar, halfvast en vast). Alle monsters werden voorgelegd voor C. difficile-testen. De basis van de voorlegging was de klinische geschiedenis van de patiënt en niet de consistentie van het monster. In het antigengedeelte laten de resultaten zien dat de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test gelijksoortig presteerde als de bacteriekweek toen er monsters van verschillende consistentie werden getest. In het toxinegedeelte laten de resultaten zien dat de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test gelijksoortig presteerde als het weefselkweek-assay toen er monsters van verschillende consistentie werden getest.

Tabel 4. Reactie van fecale monsters van variërende consistentie in het antigengedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test

Aantal monsters (n = 978)	Vloeibare monsters (n = 335)	Halfvaste monsters (n = 522)	Vaste monsters (n = 121)
Positief bij bacteriekweek-assay	59 (17,6%)	110 (21,1%)	19 (15,7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlijn positief	72 (21,5%)	128 (24,5%)	25 (20,7%)
Negatief bij bacteriekweek-assay	276 (82,4%)	412 (78,9%)	102 (84,3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlijn negatief	263 (78,5%)	394 (75,5%)	96 (79,3%)

Tabel 5. Reactie van fecale monsters van variërende consistentie in het toxinegedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test

Aantal monsters (n = 981)	Vloeibare monsters (n = 336)	Halfvaste monsters (n = 523)	Vaste monsters (n = 122)
Positief bij weefselkweek-assay	43 (12,8%)	81 (15,5%)	8 (6,6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxinelijn positief	42 (12,5%)	72 (13,8%)	7 (5,7%)
Negatief bij weefselkweek-assay	293 (87,2%)	442 (84,5%)	114 (93,4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toxinelijn negatief	294 (87,5%)	451 (86,2%)	115 (94,3%)

ANALYTISCHE GEVOELIGHEID

De scheidslijn voor het assay werd vastgesteld op concentraties van 0,63 ng/mL voor toxine A, 0, 16 ng/mL voor toxine B en 0,8 ng/mL voor glutamaatdehydrogenase.

REPRODUCEERBAARHEID

De reproduceerbaarheid van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test werd bepaald met behulp van 12 fecale monsters die werden gecodeerd om hun identificatie tijdens het testen te voorkomen. De testen werden uitgevoerd in 3 onafhankelijk laboratoria, die de monsters 3 dagen testten. De monsters produceerden 100% van de tijd de verwachte resultaten.

KRUISREACTIVITEIT

Fecale monsters geïnoculeerd met de volgende micro-organismen tot een uiteindelijke concentratie van ongeveer 10^8 of meer organismen per mL reageerden niet in het antigen- of toxinegedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test:

Bacterie of ziektekiem: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (niet-toxigeen)*, Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans)*, Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

Het enige niet-*C. difficile*-organisme dat in het toxinegedeelte van de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test reageerde, was *Clostridium sordellii* VPI 9048. Deze stam produceert de toxinen HT en LT, die homoloog zijn aan toxine A, respectievelijk B.

De volgende virussen van $10^{3,3}$ tot $10^{8,25}$ TCID- eenheden per 0,2 mL reageerden niet in de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test:

Virussen: Adenovirus types 1, 2, 3, 5, 40, 41, Human coronavirus, Coxsackievirus B2, B3, B4, B5, Echovirus 9, 11, 18, 22, 33, Enterovirus type 68, 69, 70, 71, Rotavirus.

INTERFERERENDE STOFFEN

De volgende stoffen (VS-formulering) hadden geen effect op de testresultaten wanneer ze in de aangegeven concentraties in feces aanwezig waren: mucine (3,5% g/v), menselijk bloed (40% v/v), bariumsulfaat (5% g/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectaat® (5% v/v), Peptobismol® (5% v/v), stearine-/palmitinezuur (40% g/v), metronidazol (0,25% g/v), vancomycine (0,25% g/v).

REACTIE VAN KLINISCHE ISOLATEN VERKREGEN OP CYCLOSERINE-CEFOXITIN-FRUCTOSE AGAR (CCFA)

In totaal 103 klinische isolaten van *C. difficile*, verkregen uit anaerobe bacteriekweek op CCFA na 3 dagen bij 37 °C, werden getest in de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-test. Voor de analyse werden individuele kolonies opgepikt en gesuspendeerd in *verdunner*, zoals aanbevolen voor fecale monsters. Alle 103 isolaten gaven in de test een positieve antigenreactie.

Zeventig van de 103 isolaten (68%) kwamen uit fecale monsters die positief waren voor *C. difficile*-toxine bij weefselkweek-assay. Daarvan gaven er 56 (80%) een positieve toxinereactie bij screening na anaerobe groei op CCFA gedurende 3 dagen bij 37 °C.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

BRUKSOMRÅDE

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* test er en hurtig membranenzymimmunanalyse for samtidig påvisning av *Clostridium difficile* glutamatdehydrogenase-antigen og toksin A og B i en enkelt reaksjonsbrønn. Testen påviser *C. difficile*-antigen, glutamatdehydrogenase, som en screening for tilstedeværelsen av *C. difficile* og bekrefter tilstedeværelsen av toksigent *C. difficile* gjennom å påise toksin A og B i avføringsprøver fra personer som mistenkes å ha *C. difficile*-sykdom. Testen indiseres for bruk som et hjelpemiddel til diagnostiseringen av *C. difficile*-sykdom. Som med andre *C. difficile*-tester, skal resultatene vurderes i sammenheng med pasientens historikk.

FORKLARING

Etter behandling med antibiotika utvikler mange pasienter gastrointestinale problemer som strekker seg fra mild diaré til alvorlig pseudomembranøs kolitt. Mange tilfeller av de mildere formene for gastrointestinal sykdom og de fleste tilfeller av pseudomembranøs kolitt forårsakes av toksigene stammer av *Clostridium difficile* (1). Denne organismen er en opportunistisk anerob bakterie som vokser i tarmen når den normale floraen har blitt endret av antibiotika. Toksigene stammer av *C. difficile* bærer genene som koder toksinene, mens de ikke-toksigene stammene ikke bærer toksingenene. Sykdomsbegynnelsen er assosiert med toksinene som produseres av den toksigene organismen. De kliniske symptomene som er tilknyttet sykdommen menes å være primære på grunn av toksin A, som er et vevskadende enterotoksin (2,3). *C. difficile* produserer også et andre toksin, beskrevet som toksin B. Toksin B, som har blitt henvist til som cytotoksin i organismen, er det toksinet som påvises av vevkulturanalysen som aktuelt brukes av mange laboratorier. Toksigene *C. difficile*-stammer produserer begge toksiner, eller kun toksin B (4-7). Glutamatdehydrogenasen til *C. difficile* er en bra antigenmarkør for organismen i avføring, da den produseres i store mengder av alle stammer, toksigene eller ikke-toksigene (8-10). Antigenet kan påvises i avføringsprøver ved bruk av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testen. Et positivt resultat i testen for glutamatdehydrogenase for *C. difficile* bekrefter tilstedeværelsen av denne organismen i avføringsprøver; et negativt resultat indikerer fraværet av organismen. Et positivt resultat i testen for toksin A og B bekrefter tilstedeværelsen av toksigen *C. difficile*.

PRINSIPPET FOR TESTEN

C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®-testen bruker antistoffer som er spesifikke for glutamatdehydrogenase og toksin A og B for *C. difficile*. Enheten inneholder et reaksjonsvindu med tre vertikale linjer med immobiliserte antistoffer. Antigentestlinjen (”Ag”) inneholder antistoffer mot *C. difficile* glutamatdehydrogenase. Kontrollinjen (”C”) er en prikket linje som inneholder anti-pepperrotperoksidase-antistoffer (HRP). Toksin A- og B-testlinjen (”Tox”) inneholder antistoffer mot *C. difficile*-toksin A og B. *Konjugatet* består av antistoffer for glutamatdehydrogenase og antistoffer for toksin A og B koblet til pepperrotperoksidase. For å utføre testen legges prøven til et rør som inneholder en blanding av *diluent* og *konjugat*. Den fortynnede prøve-konjugat-blandingen tilsettes *prøvebrønnen*, og enheten inkuberes ved romtemperatur i 15 minutter. I løpet av inkuberingen bindes eventuell glutamatdehydrogenase og toksin A og B i prøven til antistoff-peroksidasekonjugatene. Antigen-antistoff-konjugat-kompleksene migrerer gjennom en filterpute til en membran der de tas opp av immobiliserte glutamatdehydrogenasespesifikke og toksin A- og B-spesifikke antistoffer i linjene. *Reaksjonsvinduet* vaskes deretter med *vaskebuffer*, etterfulgt av tilsetningen av *substrat*. Etter en 10 minutters inkuberingsperiode undersøkes ”Ag”-reaksjonen visuelt for forekomst av en vertikal blå linje på ”Ag”-siden av *reaksjonsvinduet*. En blå linje indikerer en positiv test. Hvis ”Ag” er positiv, skal ”Tox”-reaksjonen undersøkes visuelt for forekomsten av en blå linje på ”Tox”-siden av *reaksjonsvinduet*. En blå linje indikerer en positiv test. En positiv ”C”-reaksjon som indikeres av en vertikal stiplet blå linje under ”C”-delen av *reaksjonsvinduet*, bekrefter at testen fungerer riktig og at resultatene er gyldige.

MEDFØLGENDE MATERIALER

MEM | DEV — ***Membranenheter*** – hver lomme inneholder 1 enhet

DIL | SPE — ***Diluent* (22 ml pr. flaske)** – Bufret proteinløsning med gradert dråpetellerenhet (Inneholder 0,05 % ProClin® 300)*

WASH | REAG — ***Vaskebuffer* (12 ml pr. flaske)** – Bufret løsning med gradert dråpetellerenhet (Inneholder 0,05 % ProClin® 300)*

SUBS | REAG — ***Substrat* (3,5 ml pr. flaske)** – Løsning som inneholder tetrametylbenzidin

CONJ | ENZ — ***Konjugat* (2,5 ml pr. flaske)** – Monoklonalt antistoff fra mus som er spesifikt for glutamatdehydrogenase som er bundet til pepperrotperoksidase og polyklonale antistoffer fra geit som er spesifikke for toksin A og B som er bundet til pepperrotperoksidase i en bufret proteinløsning (Inneholder 0,05 % ProClin® 300)*

CONTROL | + — ***Positiv kontroll* (2 ml)** – Antigen i en bufret proteinløsning

Engangsoverføringspipetter i plast – gradert ved 25 µl, 400 µl og 500 µl

IVD — Til *in vitro*-diagnostisk bruk

*Signalord: Advarsel
H317: Kan fremkalle en allergisk reaksjon.
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

NØDVENDIGE MATERIALER OG UTSTYR SOM IKKE MEDFØLGER

Små testrør (f.eks. Eppendorf-rør i plast eller glassrør)
Applikatorpinner *Timer* *Vorteksblander*
Engangshansker for håndtering av avføringsprøver *Pipette og sisser*

LEVETID OG OPPBEVARING

Kitets utløpsdato er angitt på etiketten. Utløpsdatoer for hver komponent er angitt på de enkelte etikettene. Kitet skal oppbevares mellom 2 °C og 8 °C.

FORSIKTIGHETSREGLER

1. Reagenser fra ulike kit skal ikke blandes eller veksles med hverandre. Kitet må ikke brukes etter utløpsdatoen.
2. Hver komponent i kitet skal inspiseres for tegn på lekkasje. Ved ankomst, inspiser kitet for å garantere at komponentene ikke er frosne eller varme å berøre på grunn av feil forsendelsesbetingelser.
3. Bring alle komponentene til ROMTEMPERATUR FØR BRUK!
4. Hetter, spisser og dråpetellerenheter er fargekodet; de må IKKE blandes eller veksles med hverandre!
5. Reagensene skal ikke fryses. Kitet skal oppbevares mellom 2 °C og 8 °C.
6. Posen som inneholder *membranenheten* skal være ved romtemperatur før åpning. Hold membranenhetene tørre før bruk.

NO

7. Bruk avføringsprøver innen 72 timer etter taking for å oppnå optimale resultater. Prøver som er frosne kan miste aktivitet på grunn av frysing og opptining. Ved bruk av frosne prøver, tin opp ved romtemperatur.
8. Hold reagensflaskene vertikalt for å dispensere reagensene for å sikre konsekvent dråpestørrelse og riktig volum.
9. Prøver og membranenheter skal håndteres og bortskaffes som potensielt biologisk farlige elementer etter bruk.
10. Membranenheten kan ikke brukes på nytt.
11. Testen har blitt optimalisert for sensitivitet og spesifisitet. Endringer av den spesifiserte prosedyren og/eller testbetingelsene kan påvirke sensitiviteten og spesifisiteten til testen. Ikke avvik fra den spesifiserte prosedyren.
12. Vær oppmerksom på den totale analysetiden ved testing av mer enn én avføringsprøve. Tilsett først *diluent*, og tilsett deretter *konjugat* til hvert rør med *diluent*. Tilsett deretter prøve til røret med *diluent/konjugat*. Bland grundig alle de fortynnede prøvene og overfør til *membranenheten*. Det 15-minutters inkubasjonstrinnet begynne etter at den siste fortynnede prøve-konjugatblandingen har blitt overført til den endelige *membranenheten*.
13. Hvis *substratreagensen* endres til en mørk blå/fiolett farge, ring tekniske tjenester for utskiftning.
14. Avføringsprøver kan inneholde potensielt smittefarlige stoffer og skal håndteres ved "biologisk sikkehetsnivå 2" som anbefalt i CDC/NIH-håndboken "Biologisk sikkerhet i mikrobiologiske og biomedisinske laboratorier".
15. Alle reagenser er kun til *in vitro*-diagnostisk bruk.
16. Bruk engangshansker ved utføring av testen.
17. Reagensene inneholder 0,05 % ProClin® 300 som konserveringsmiddel. Selv om konsentrasjonen er lav, er det kjent at ProClin® 300 er skadelig. Hvis det oppstår irritasjon eller utslett, oppsøk lege. Ta av kontaminerte klær, og vask dem før du bruker dem igjen. Håndter reagensene i henhold til eksisterende bestemmelser for laboratoriesikkerhet og god laboratoriepraksis. Sikkerhetsdataark for dette produktet fås på forespørsel. Kontakt avdelingen for teknisk støtte.
18. Følg nasjonale, regionale og lokale bestemmelser for avfallshåndtering.

TAKING, HÅNDTERING OG OPPBEVARING AV AVFØRINGSPRØVER

Akseptable prøvetyper
Ferske avføringsprøver
Frosne avføringsprøver
Prøver i transportmedier (Cary Blair, C&S)

Må ikke brukes
Avføringsprøver i formalinbasert fiksativ (f.eks. natriumacetatformalin, 10 % formalin, mertiolat-formalin)
Avføringsprøver i alkoholbasert fiksativ (f.eks. polyvinylalkohol)

Oppbevaring av prøver Temperatur	Akseptabel oppbevaringslengde	Kommentarer
2 °C – 8 °C	72 timer	Ideelle prøver er mindre enn 24 timer gamle
Frosne ≤ -10 °C	Lengre enn 72 timer	Tin opp ved romtemperatur. Frysing og tining flere ganger kan føre til prøvetapsaktivitet på grunn av toksindegradering.

1. Standard prøvetakings- og håndteringsprosedyrer som brukes internt for avføringsprøver er passende.
2. Avføringsprøver skal tas i rene, lekkasjebestandige beholdere.
3. Oppbevaring av avføringsprøver i *diluenten* anbefales IKKE.
4. Ikke la avføringsprøvene forbli i diluent/konjugat-blandingen i > 24 timer.

PRØVEFORBEREDELSE

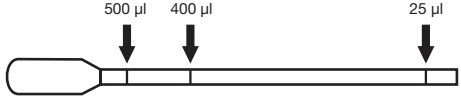
1. Bring alle reagensene og det nødvendige antallet enheter til romtemperatur før bruk. Det anbefales å fjerne reagensene fra skuminnsatsen for å redusere tiden som er nødvendig for å varme opp til romtemperatur.
2. Sett opp og merk ett lite testrør for hver prøve, samt alternative eksterne kontroller etter behov.
3. Ved bruk av den svarte graderte dråpetellerenheten tilsett 750 µl (2. gradering fra spissen) *diluenten* til hvert rør for avføringsprøver. **For prøver i transportmedier, slik som Cary Blair eller C&S, tilsett 650 µl (1. gradering fra spissen) *diluent* til røret.**

Prøvetype	*Diluent*volum
Ferske avføringsprøver	750 µl (2. gradering fra spissen)
Frosne avføringsprøver (frosne ufortynnet)	750 µl (2. gradering fra spissen)
Prøver i transportmedier (Cary Blair, C&S)	650 µl (1. gradering fra spissen)
Eksterne kontroller (positive og negative)	750 µl (2. gradering fra spissen)



4. Tilsett én dråpe *konjugat* (flaske med rødt lokk) til hvert rør.
5. Få én kasserbar plastoverføringspipette (forsynt med settet) for hver prøve – pipettene har økt graderinger ved 25 µl, 400 µl og 500 µl.

Gradert overføringspipette:



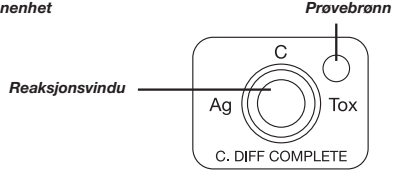
6. **Bland alle prøvene grundig uansett konsistens – det er avgjørende at prøvene suspenderes jevnt før overføring.**
   Flytende/halvfaste prøver – pipetter 25 µl prøve med overføringspipette og dispenser til *diluent/konjugat*-blandingen. Bruk den samme overføringspipetten til å blande den fortynnede prøven.
   Formede/faste prøver – Det må utvises forsiktighet for å ta riktig mengde formet avføring til prøveblandingen. Bland prøven grundig ved bruk av en treapplikatorpinne og overfør en liten del (omtrent 2 mm diameter, tilsvarende 25 µl) av prøven til diluent/konjugat-blandingen. Emulger prøven ved bruk av applikatorpinnen.
   Avføringsprøver i Cary Blair elle C&S transportmedier - pipetter 100 µl (2 dråper fra overføringspipette) prøver i *diluent/konjugat-blandingen*.
7. **Alternative eksterne kontrollprøver:**
   Ekstern positiv kontroll - tilsett én dråpe *positiv kontroll* (flaske med grått lokk) i *diluent/konjugat-blandingen*.
   Ekstern negativ kontroll - tilsett 25 µl *diluent* i *diluent/konjugat-blandingen*.

NO

MERK: Overføring av for lite prøve eller ufullstendig blanding og suspendering av prøven i diluent(konjugat-blandingen kan føre til et falskt negativt testresultat. Tilsetningen av for mye avføringsprøve kan forårsake ugyldige resultater på grunn av begrenset prøveflyt.

TESTPROSEDYRE

1. Få én *membranenhet* pr. prøve og én enhet pr. alternativ ekstern positiv eller negativ kontroll etter behov. Folieposene som inneholder enhetene skal bringes til romtemperatur før de åpnes. Bruk enheten umiddelbart etter åpning. Merk hver enhet tilstrekkelig og orienter den på en flat overflate slik at "C. DIFF COMPLETE"-påskriften er på bunnen av enhete og den lille prøvebrønnen befinner seg øverst i høyre hjørne av enheten.

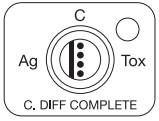


2. Lukk hvert rør med fortynnet prøve og bland grundig. Riktig blanding kan kun oppnås gjennom å utføre vorteks eller ved å vende røret. Når en pasientprøve eller en *positiv kontroll* har blitt fortynnet i *diluent/konjugat*-blandingen, kan den inkuberes ved romtemperatur i hvilken som helst tidsperiode på opptil 24 timer før tilsetning av *membranenheten*.
3. Bruk en ny overføringspipette, overfør 500 µl av den fortynnede prøve-konjugat-blandingen til ***prøvebrønnen*** (mindre hull i øverste høyre hjørne i enheten) til en *membranenhet*, og se til at de flytende prøven utstøtes på viklingsputen på innsiden av *membranenheten*. Ved lasting av prøven i prøvebrønnen se til at spissen på overføringspipetten er vinklet mot *reaksjonsvinduet* (større hull i midten av enheten). .
4. Inkuber enheten ved romtemperatur i 15 minutter – prøven vil vikles gjennom enheten, og et vått område vil spres over *reaksjonsvinduet*.
   MERKNAD FOR PRØVER SOM IKKE MIGRERER:
   Noen ganger kan en fortynnet prøve ikke migrere riktig, og reaksjonsvinduet blir ikke helt vått. Hvis reaksjonsvinduet ikke ser ut til å være helt vått innen 5 minutter etter tilsetning av prøven til prøvebønnen, tilsett 100 µl (4 dråper) diluent til prøvebrønnen og vent i ytterligere 5 minutter (i totalt 20 minutter).
5. Etter inkuberingen tilsett 300 µl *vaskebuffer* til ***reaksjonsvinduet*** ved bruk av den graderte hvite dråpetellerenheten. La *vaskebufferen* flyte gjennom reaksjonsvinduets membran og absorberes fullstendig.
6. Tilsett 2 dråper *substrat* (flaske med hvitt lokk) til ***reaksjonsvinduet***. Avles og registrer resultatene visuelt etter 10 minutter.

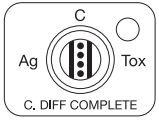
TOLKNING AV RESULTATER

1. Tolkning av testen er mest pålitelig når enheten avleses rett etter utløpet av den 10 minutters reaksjonsperioden. Avles enheten ved en normal arbeidsavstand i et godt belyst område. Se med en synslinje som er rett over enheten.
2. Observer enheten for forekomst av blå prikker i midten av *reaksjonsvinduet*, hvilket representerer den interne positive kontrollen. Forekomsten av eventuell kontrollprikk(er) representerer en gyldig intern kontroll. Bakgrunnen kan se ut til å være hvit til lyseblå i fargen. Observer enheten for forekomst av blå linjer på "Ag"- og "Tox"-sidene av *reaksjonsvinduet*, hvilket representerer testlinjene. Linjene kan vises svake til mørke i intensitet.
3. **Positivt antigenresultat ("Ag"):** Et positivt antigenresultat kan tolkes når som mellom tilsetningen av *substratet* og den 10-minutters avlesingstiden. For et positivt antigenresultat er den blå "Ag"-linjen og den stiplede blå kontrolllinjen nedenfor "C" er synlig (figur 1a). Linjene kan vises svake til mørke i intensitet. En tydelig delvis linje tolkes som et positivt resultat. Ikke tolk membranmisfarging som et positivt resultat. Et positivt resultat indikerer tilstedeværelsen av *C. difficile*.
4. **Positivt antigen- og toksinresultat ("Tox"):** Hvis antigenresultatet er positivt (dvs. en blå "Ag"-linje og en stiplet blå kontrollinje under "C" er synlig), fortsett til tolkningen av toksinresultatet. Et positivt toksinresultat kan tolkes når som mellom tilsetningen av *substratet* og den 10-minutters avlesingstiden. For et positivt toksinresultat finnes en synlig blå "Tox"-linje (figur 1b). Linjen kan vises svake til mørke i intensitet. En tydelig delvis linje tolkes som et positivt resultat. Ikke tolk membranmisfarging som et positivt resultat. Et positivt resultat indikerer tilstedeværelsen av *C. difficile*-toksin.
5. **Negativt resultat:** En test kan ikke tolkes som negativ eller ugyldig inntil 10 minutter etter tilsetning av *substratet*. En enkelt blå stiplet linje er synlig i midten av *reaksjonsvinduet,* under "C", og ingen testlinjer er synlige på "Ag"-siden eller "Tox"-siden av *reaksjonsvinduet* (figur 1c). Et negativt resultat i antigendelen indikerer at *C. difficile*-antigenet enten er fraværende i prøven eller at det er under påvisningsgrensen til testen. Et negativt resultat i toksindelen indikerer at C. difficile-toksinet enten er fraværende i prøven eller at det er under påvisningsgrensen til testen.
6. **Ugyldig resultat:** Ingen linjer er synlige i reaksjonsvinduet (figur 1d). Testresultatet er ugyldig hvis en blåstiplet linje ikke er til stede under "C" ved fullføring av reaksjonsperioden (figur 1e, 1f, 1g).
7. **Negativt antigen ("Ag"), positivt toksin ("Tox"):** En lav prosentandel prøve kan teste negativt for antigen, men positivt for toksin. Disse prøvene skal anses som ubestemmelige og testes på nytt ved bruk av en fersk prøve (figur 1h). Hvis prøven igjen tester negativt for antigen, men positivt for toksin, rapporter som positivt toksinresultat.

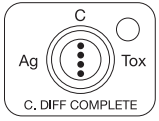
FIGUR 1: *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® TOLKNING AV RESULTATER



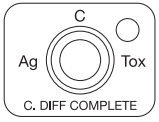
Figur 1a
Positivt antigenresultat



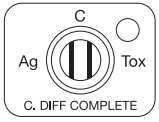
Figur 1b
Positivt antigen
- og toksinresultat



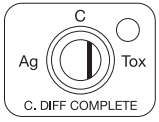
Figur 1c
Negativt resultat



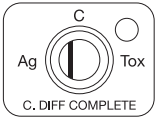
Figur 1d
Ugyldig resultat



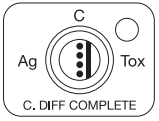
Figur 1e
Ugyldig resultat



Figur 1f
Ugyldig resultat



Figur 1g
Ugyldig resultat



Figur 1h
Se nr. 7 for tolkning

KVALITETSKONTROLL

Internt: En stiplet blå linje må være synlig i midten av *reaksjonsvinduet*, under "C" på hver *membranenhet* som testes. Forekomsten av de blå kontrollprikkene bekrefter at prøven og reagensene ble riktig tilsatt, at reagensene var aktive på tidspunktet for utføring av analysen og at prøven migrerte riktig gjennom *membranenheten*. Det bekrefter også reaktiviteten til de andre reagensene som er tilknyttet analysen. En klar bakgrunn i resultatområdet anses som en intern negativ kontroll. Hvis testen har blitt utført riktig, og reagensene fungerer riktig, vil bakgrunnen være hvit for å gi et tydelig resultat.
Eksternt: Reaktiviteten til *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-kitet skal verifiseres ved mottak ved bruk av den *positive kontrollen* og den negative kontrollen (*diluent*). Den *positive kontrollen* leveres med kitet (flaske med grått lokk). Den *positive kontrollen* bekrefter reaktiviteten til de andre reagensene som er tilknyttet analysen, og er ikke beregnet til å garantere presisjon ved analytisk analyse-cut-off. *Diluenten* brukes til den negative kontrollen. Flere tester kan utføres med kontrollene for å oppfylle kravene i lokale, statlige og/eller nasjonale forskrifter og/eller akkrediteringsorganisasjoner.

BEGRENSNINGER

1. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen brukes til å påvise C. difficile-antigen og toksin(er) i avføringsprøver. Testen bekrefter tilstedeværelse av toksin i avføring, og denne informasjonen skal tas i vurdering av legen i lys av den kliniske historikken og den fysiske undersøkelsen av pasienten. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen vil påvise nivåer av toksin A ved ≥ 0,63 ng/ml, toksin B ved ≥ 0,16 ng/ml og glutamatdehydrogenase ved ≥ 0,8 ng/ml.
2. Avføringsprøver er ekstremt komplekse. Optimale resultater med *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen oppnås med prøvene som er mindre enn 24 timer gamle. De fleste ufortynnede prøvene kan oppbevares mellom 2 °C og 8 °C i 72 timer før det merkes betydelig forringelse av toksinet. Hvis prøvene ikke analyseres innenfor denne tidsperioden, kan de fryses og tines opp. Men gjentatt frysing og tining kan imidlertid føre til tap av immunreaktiviteten til antigen og toksin A og B.
3. Noen prøver kan gi svake reaksjoner. Dette kan skyldes flere faktorer, slik som tilstedeværelse av lave nivåer av antigen og/eller toksin, tilstedeværelsen av bindende stoffer eller inaktiverende enzymer i avføringen. Linjene kan vises svake til mørke i intensitet. Disse prøvene skal rapporteres som positive hvis noen blå linje, selv en delvis linje, er synlig. En tydelig delvis blå linje tolkes som et positivt resultat.
4. Avføringsprøver konserveres i 10 % formalin, mertiolatformalin, natriumacetatformalin eller polyvinylalkohol kan ikke brukes.
5. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen er kvalitativ. Intensiteten til fargen skal ikke tolkes kvantitativt.
6. Noen isolater av *C. sordellii* kan reagere i *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen på grunn av produksjonen av immunologisk relaterte toksiner (1).
7. Koloniseringshastigheter på opptil 50 % har blitt rapportert hos spedbarn. En høy hastighet har også blitt rapportert hos cystisk fibrosepasienter (1,3). Resultatene kan se positive ut i disse gruppene, men skal ses i sammenheng med potensialet for å være en kolonisert bærer.
8. Den eneste ikke-*C. difficile*-organismen som reagerer i toksindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen var *Clostridium sordellii* VPI 9048. Denne stammen produserer toksin HT og LT, som er homologe for respektivt toksin A og B.
9. Det finnes ingen data om virkningene av skyllinger, bariumklyster, laksativer eller tarmklargjøringer på ytelsen til *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen. Alle disse prosedyrene kan føre til omfattende fortynning eller tilstedeværelse av tilsetningsmidler som kan påvirke testytelsen.

FORVENTEDE VERDIER

Clostridium difficile-sykdommen er primært en nosocomial sykdom hos eldre pasienter, og frekvensen til sykdommen avhenger av faktorer slik som pasientpopulasjon, type institusjon og epidemiologi. Den rapporterte forekomsten av *C. difficile*-sykdom hos pasienter med antibiotika-assosiert diaré kan strekke seg fra 5 til 20 %, og sykehusene kan oppleve rater som er lavere eller høyere enn dette området. Det er viktig å vurdere alle testresultater i sammenheng med kliniske symptomer fordi noen friske voksne og store antall friske spedbarn (opptil 50 %) vil være positive for *C. difficile*-toksin. I tillegg har *C. difficile*-bæringsrater på 22 % til 32 % blitt rapportert i cystisk fibrose-pasienter (1,3). I studiene som ble gjennomført for denne enheten, ved bruk av symptomatiske pasienter, var forekomsten av toksin A og B 12 %, og GDH var 18 %. Et positivt resultat i antigendelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen bekrefter tilstedeværelsen av *C. difficile* i en avføringsprøve; et negativt resultat indikerer fraværet av organismen. Et positivt resultat i toksindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® bekrefter tilstedeværelsen av *C. difficile*-toksin i en avføringsprøve; et negativt resultat indikerer fraværet av toksinet eller tilstrekkelige nivåer av toksin for påvisning.

YTELSESKARAKTERISTIKKER

Klinisk evaluering av antigendelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen
Antigendelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen ble sammenlignet med bakteriell kultur. Prøver som er inkludert i evalueringen ble innlevert til kliniske laboratorier for rutinemessig testing. Bakteriekulturtesten ble utført i henhold til interne prosedyrer. Resultatene vises i tabell 1.

Tabell 1. Sammendrag av klinisk ytelse som sammenligner *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen med bakteriell kultur.

n = 1126	Bakteriell kultur Positiv	Bakteriell kultur Negativ
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinje positiv	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinje negativ	21	842

		95 % konfidensgrenser
Sensitivitet	90,5%	85,7 – 93,9
Spesifisitet	93,1%	91,2 – 94,7
Prediktiv positiv verdi	76,4%	70,7 – 81,3
Prediktiv negativ verdi	97,6%	96,2 – 98,4
Korrelasjon	92,6%	91,8 – 93,4

Uoverensstemmende prøver ble evaluert ved bruk av aktuelle ELISA-tester for *C. difficile* glutamatdehydrogenase.
29 av de 62 falske positive prøvene var positive med en annen GDH-test og ble ansett som ekte positive.

NO

13 av de 21 falske negative prøvene var negative med en annen GDH-test og ble ansett som ekte negative.

Antigendelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen ble sammenlignet med vevkulturanalysen for påvisning av C. difficile-toksinet. Prøver som er inkludert i evalueringen ble innlevert til kliniske laboratorier for rutinemessig testing. Resultatene vises i tabell 2. Antigendelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen påviste 98,7 % av de vevskultur-positive prøvene.

Tabell 2. Sammendrag av klinisk ytelse som sammenligner *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen med vevskulturanalysen.

n = 1126	Vevskultur Positiv	Vevskultur Negativ
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinje positiv	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinje negativ	2	861

Klinisk evaluering av toksindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen
Toksindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen ble sammenlignet med vevskulturanalysen ved to kliniske laboratorier og internt hos TECHLAB®, Inc. Prøvene som var inkludert i evalueringen, ble innlevert til de kliniske laboratoriene for rutinemessig testing. Resultatene vises i tabell 3.

Tabell 3. Sammendrag av klinisk ytelse som sammenligner *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen med vevskulturanalysen.

n = 1126	Vevskultur Positiv	Vevskultur Negativ
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toksinlinje positiv	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toksinlinje negativ	19	964

		95 % konfidensgrenser
Sensitivitet	87,8%	81,4 - 92,3
Spesifisitet	99,4%	98,6 - 99,7
Prediktiv positiv verdi	95,8%	90,7 - 98,3
Prediktiv negativ verdi	98,1%	96,9 - 98,8
Korrelasjon	97,8%	97,6 - 98,0

Uoverensstemmende prøver ble evaluert ved bruk av aktuelle ELISA-tester for toksin A og B.
5 av de 6 falske positive prøvene var positive med ELISA og ble ansett som ekte positive.
12 av de 19 falske negative prøvene var negative med ELISA og ble ansett som ekte negative.

VIRKNING AV AVFØRINGSPRØVENS KONSISTENS

Virkningen av avføringsprøvens konsistens på *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen
Reaksjonen til avføringsprøvene av varierende konsistenser i antigendelen (n = 978) og toksindelen (n = 981) til *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen vises i tabell 4 og 5. Prosentandelene positive reaksjoner ved bruk av enten kulturanalysen eller *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen var lignende i alle tre typer avføringsprøver (flytende, halvfast og fast). Alle prøvene ble innsendt for C. difficile-testing. Grunnlaget for innsendingen var den kliniske historikken til pasienten og ikke konsistensen på prøven. I antigendelen viste resultatene at *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen ga lignende ytelsen som bakteriell kultur ved testing av prøver av ulik konsistens. I toksindelen viste resultatene at *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen ga lignende ytelsen som vevskulturanalyse ved testing av prøver av ulik konsistens.

Tabell 4. Reaksjon med avføringsprøver av ulik konsistens i antigendelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen

Antall prøver (n = 978)	Flytende prøver (n = 335)	Halvfaste prøver (n = 522)	Faste prøver (n = 121)
Positiv med bakteriekulturanalyse	59 (17,6%)	110 (21,1%)	19 (15,7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinje positiv	72 (21,5%)	128 (24,5%)	25 (20,7%)
Negativ med bakteriekulturanalyse	276 (82,4%)	412 (78,9%)	102 (84,3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antigenlinje negativ	263 (78,5%)	394 (75,5%)	96 (79,3%)

Tabell 5. Reaksjon med avføringsprøver av ulik konsistens i toksindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testen

Antall prøver (n = 981)	Flytende prøver (n = 336)	Halvfaste prøver (n = 523)	Faste prøver (n = 122)
Positiv med vevskulturanalyse	43 (12,8%)	81 (15,5%)	8 (6,6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toksinlinje positiv	42 (12,5%)	72 (13,8%)	7 (5,7%)
Negativ med vevskulturanalyse	293 (87,2%)	442 (84,5%)	114 (93,4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toksinlinje negativ	294 (87,5%)	451 (86,2%)	115 (94,3%)

ANALYTISK FØLSOMHET
Cutoff for analysen ble etablert ved konsentrasjoner på 0,63 ng/ml for toksin A, 0,16 ng/ml for toksin B og 0,8 ng/ml for glutamatdehydrogenase.

REPRODUSERBARHET
Reproduserbarheten til *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testen ble bestemt ved bruk av 12 avføringsprøver som ble kodet fo å forhindre identifiseringen i løpet av testingen. Testingen ble utført ved 3 uavhengige laboratorier, som testet prøvene i 3 dager. Prøvene ga de forventede resultatene 100 % av tiden.

KRYSSREAKTIVITET
Avføringsprøver som ble inokulert med følgende mikroorganismer til en endelig konsentrasjon på omtrent 10^8 eller høyere organismer pr. ml reagerte ikke i antigen- eller toksindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testen:

Bakterie eller patogen: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (non-toksigen), *Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans), *Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

Den eneste ikke-*C. difficile*-organismen som reagerer i toksindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testen var *Clostridium sordellii* VPI 9048. Denne stammen produserer toksin HT og LT, som er homologe for respektivt toksin A og B.

De følgende virusene på $10^{3,3}$ til $10^{8,25}$ TCID-enhete pr. 0,2 ml reagete ikke i *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testen:

Virus: Adenovirus type 1, 2, 3, 5, 40, 41, humant coronavirus, coxsackievirus B2, B3, B4, B5, echovirus 9, 11, 18, 22, 33, enterovirus type 68, 69, 70, 71, rotavirus.

INTERFERERENDE STOFFER
De følgende stoffene (amerikansk formel) hadde ingen virkning på testresultatene når de var til stede i avføringen i de angitte konsentrasjonene: mucin (3,5 % w/v), humant blod (40 % v/v), bariumsulfat (5 % w/v), Imodium® (5 % v/v), Kaopectate® (5 % v/v), Pepto-Bismol® (5 % v/v), stearin-/palmitinsyre (40 % w/v), metronidazol (0,25 % w/v), vancomycin (0,25 % w/v).

REAKSJONEN TIL KLINISKE ISOLATER SOM FÅS PÅ CYKLOSERINCEFOKSITINFRUKTOSEAGAR (CCFA)
Totalt 103 *C. difficile* kliniske isolater, som fås fra anatomisk bakteriekultur på CCFA etter 3 dager ved 37 °C, ble testet i *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testen. For analysen ble enkelte kolonier plukket og suspendert i *diluent* som anbefalt for avføringsprøver. Alle 103 isolater ga en positiv antigenreaksjon i testen.

70 av de 103 isolatene (68 %) var fra avføringsprøver som var positive for *C. difficile*-toksinet gjennom vevkulturanalyse. Av disse ga 56 (80 %) en positiv toksinreaksjon ved screening etter anaerob vekst på CCFA i 3 dager ved 37 °C.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

AVSEDD ANVÄNDNING

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet är en snabb immunoanalys av membranenzym för samtidigt påvisande av *Clostridium difficile* glutamatdehydrogenasantigen och toxinerna A och B i feacesprover. Testet påvisar*C. difficile* glutamatdehydrogenasantigen, som en undersökning för förekomst av *C. difficile* och bekräftar förekomst av toxigenisk *C. difficile* genom påvisande av toxinerna A och B i feacesprover från personer med misstänkt *C. difficile*-sjukdom. Testet används för att underlätta diagnosen *C. difficile*-sjukdom. Resultaten ska som med andra *C. difficile*-tester övervägas tillsammans med patientens anamnes.

FÖRKLARING

Många patienter utvecklar mag-tarmbesvär som varierar från lindrig diarré till svår pseudomembranös kolit efter antibiotikabehandling. Många fall av lindrigare former av mag-tarmsjukdom och de flesta fall av pseudomembranös kolit orsakas av toxigeniska stammar av *Clostridium difficile* (1). Denna organism är en opportunistisk anaerob bakterie som växer i tarmen när normalfloran har förändrats av antibiotikumet. Toxigeniska stammar av *C. difficile* bär generna som kodar för toxinerna medan icke-toxigeniska stammar inte bär toxingenerna. Sjukdomsdebuten är knuten till toxinerna som bildas av den toxigeniska organismen. De kliniska symtomen i samband med sjukdomen antas primärt bero på toxin A, som är ett vävnadsskadande enterotoxin (2,3). *C. difficile* bildar även ett andra toxin som benämns toxin B. Toxin B, som har kallats för organismens cytotoxin, är toxinet som påvisas av den vävnadsodlingsanalys som för närvarande används av många laboratorier. Toxigeniska *C. difficile*-stammar bildar båda toxinerna eller enbart toxin B (4-7). Glutamatdehydrogenasantigenet för *C. difficile* är en bra antigenmarkör för organismen i faeces eftersom det bildas i stora mängder av alla toxigeniska eller icke-toxingeniska stammar (8-10). Antigenet kan påvisas i faecesprover genom användning av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet. Ett positivt resultat i testet för glutamatdehydrogenasantigenet för *C. difficile* bekräftar förekomsten av denna organism i ett faecesprov; ett negativt resultat indikerar frånvaro av organismen. Ett positivt resultat i testet för toxinerna A och B bekräftar förekomst av toxigenisk *C. difficile*.

TESTPRINCIP

C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®-testet använder specifika antikroppar för glutamatdehydrogenasantigen och toxinerna A och B för *C. difficile*. Anordningen innehåller ett reaktionsfönster med tre vertikala linjer för immobiliserade antikroppar. Antigentestets linje (”Ag”) innehåller antikroppar mot *C. difficile* glutamatdehydrogenasantigen. Kontrollinjen (”C”) är en prickig linje som innehåller anti-pepparrotsperoxidasantikroppar (anti-HRP, anti-horseradish peroxidase). Testlinjen för toxinerna A och B (”Tox”) innehåller antikroppar mot toxinerna A och B för *C. difficile* . *Konjugatet* består av antikroppar till glutamatdehydrogenas och antikroppar till toxinerna A och B kopplade till pepparrotsperoxidas (HRP). För att utföra testet tillsätts provet till ett rör som innehåller en blandning av *Spädningsmedel* och *Konjugat*. Den utspädda prov-konjugatblandningen tillsätts till *Provbrunnen* och anordningen tillåts inkuberas till rumstemperatur i 15 minuter. Under inkubationen binds någon glutamatdehydrogenas och toxinerna A och B i provet till antikroppsperoxidaskonjugatet. Antigen-antikropp-konjugatblandningen förflyttas genom ett filterdyna till ett membran där de fångas upp av de immobiliserade glutamatdehydrogenasspecifika antikropparna och toxinerna A-och B-specifika antikropparna i linjerna. *Reaktionsfönstret* tvättas därefter med *Tvättbuffert* och därefter tillsätts *Substrat*. Efter 10 minuters inkubation undersöks ”Ag”-reaktionen visuellt för tecken på en vertikal blå linje på *Reaktionsfönstrets* ”Ag”-sida. En blå linje indikerar ett positivt test. Om ”Ag” är positivt ska ”Tox”-reaktionen undersökas visuellt för tecken på en vertikal blå linje på *Reaktionsfönstrets* ”Tox”-sida. En blå linje indikerar ett positivt test. En positiv ”C”-reaktion, som indikeras av en vertikal blåprickig linje under *Reaktionsfönstrets* ”C”-del, bekräftar att testet fungerar korrekt och att resultaten är giltiga.

MEDFÖLJANDE MATERIAL

MEM | DEV — ***Membrananordningar*** – varje påse innehåller 1 anordning

DIL | SPE — ***Spädningsmedel* (22 ml per flaska)** – buffrad proteinlösning med graderade pipetter (innehåller 0,05 % ProClin® 300)*

WASH | REAG — ***Tvättbuffert* (12 ml per flaska)** – buffrad proteinlösning med graderade pipetter (innehåller 0,05 % ProClin® 300)*

SUBS | REAG — ***Substrat* (3,5 ml per flaska)** – lösning som innehåller tetrametylbensidin

CONJ | ENZ — ***Konjugat* (2,5 ml per flaska)** – monoklonala musantikroppar specifika för glutamatdehydrogenas kopplade till pepparrotsperoxidas och polyklonala getantikroppar specifika för toxinerna A och B kopplade till pepparrotsperoxidas i en buffrad proteinlösning (innehåller 0,05 % ProClin® 300)*

CONTROL | + — ***Positiv kontroll* (2 ml)** – antigen i en buffrad proteinlösning

Plastpipetter för engångsbruk – graderade vid 25 µL, 400 µL och 500 µL

IVD — För *in vitro*-diagnostiskt bruk

*Signalord: Varning
H317: Kan orsaka allergisk hudreaktion
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

MATERIAL OCH UTRUSTNING SOM BEHÖVS MEN SOM INTE MEDFÖLJER PRODUKTEN

Små provrör (t.ex. Eppendorf-rör av plast eller glasrör)
Applikatorpinnar — *Stoppur* — *Centrifug*
Engångshandskar för hantering av feacesprover — *Pipetter och spetsar*

HÅLLBARHET OCH FÖRVARING

Setets utgångsdatum anges på etiketten. Utgångsdatum för varje komponent anges på de enskilda etiketterna. Setet ska förvaras mellan 2 °C och 8 °C.

FÖRSIKTIGHET

1. Reagenser från olika set får inte blandas eller bytas ut. Använd inte ett set efter passerat utgångsdatum.
2. Varje komponent i setet ska granskas för eventuella tecken på läckage. Granska setet vid leverans för att säkerställa att komponenterna inte är kalla eller varma, när man vidrör dem, på grund av felaktiga fraktförhållanden.
3. Ta fram alla komponenter i RUMSTEMPERATUR FÖRE ANVÄNDNING!
4. Korkar, spetsar och pipetter är färgkodade och ska INTE blandas eller bytas ut!
5. Frys inte reagenserna. Setet ska förvaras mellan 2 °C och 8 °C.

6. Påsen som innehåller *Membrananordningen* ska ligga i rumstemperatur innan den öppnas. Låt membrananordningar torka före användning.
7. Använd av feacesprover inom 72 timmar efter insamlande för att uppnå optimala resultat. Prover som är frysta kan förlora aktivitet på grund av nedfrysning och upptinande. Om frysta prover används, ska de tinas upp i rumstemperatur.
8. Håll reagensflaskor vertikalt för fördelning av reagenser för att säkerställa jämn droppstorlek och rätt volym.
9. Prover och membrananordningar ska hanteras och kastas som biologiskt riskavfall efter användning.
10. Membrananordningar får inte återanvändas.
11. Testet har optimerats för känslighet och specificitet. Ändringar i den angivna proceduren och/eller av testförhållanden kan påverka testets känslighet och specificitet. Avvik inte från den angivna proceduren.
12. Var uppmärksam på den totala analystiden vid test av fler än ett faecesprov. Tillsätt först *Spädningsmedel* och tillsätt sedan *konjugat* i varje rör med *Spädningsmedel*. Tillsätt sedan provet i röret med *Spädningsmedel/Konjugat*. Blanda alla de utspädda proverna noga och överför till *Membrananordningen*. Inkubationssteget på 15 minuter påbörjas när den sista utspädda prov-konjugatblandningen har överförts till den slutliga *Membrananordningen*.
13. Om *Substrat*-reagenset ändras till en mörkblå/mörklila färg, ring teknisk service för utbyte.
14. Faecesprover kan innehålla potentiellt infektiösa ämnen och ska hanteras på ”Biosäkerhetsnivå 2” enligt rekommendationer i bruksanvisningen ”Biosäkerhet i mikrobiologiska och biomedicinska laboratorier” från CDC/NIH.
15. Alla reagenser är endast avsedda för *in vitro*-diagnostiskt bruk.
16. Använd engångshandskar vid utförande av testet.
17. Reagenserna innehåller 0,05 % ProClin® 300 som konserveringsmedel. ProClin® 300 kan vara hälsoskadligt, även i små koncentrationer. Sök läkarvård/råd om hudirratationer eller utslag uppstår. Ta av kontaminerade klädesplagg och tvätta innan du använder dem igen. Hantera reagenser enligt befintliga föreskrifter för laboratoriesäkerhet och god laboratoriesed. Säkerhetsdatablad för produkten finns tillgängliga från teknisk support på begäran.
18. Följ nationella och lokala riktlinjer för avfallsbortskaffning.

INSAMLING, HANTERING OCH FÖRVARING AV FEACESPROVER

Tillåtna typer av prover
Färska feacesprover
Frysta faecesprover
Prover i transportmedia (Cary Blair, C&S)

Använd inte
Faecesprover i formalinbaserat fixeringsmedel (t.ex. natriumacetatformalin, 10 % formalin, mertiolatformalin)
Faecesprover i alkoholbaserat fixeringsmedel (t.ex. polyvinylalkohol)

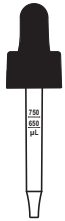
Provförvarings-temperatur	Tillåten förvaringslängd	Kommentarer
2 °C–8 °C	72 timmar	De idealiska proverna är mindre än 24 timmar gamla
Fryst ≤ -10 °C	Längre än 72 timmar	Tinas upp i rumstemperatur. Nedfrysning och upptinande flera gånger kan resultera i förlorad provaktivitet på grund av toxinnedbrytning.

1. Standardprocedurer för insamlande och hantering som används på laboratoriet är lämpliga.
2. Faecesprover ska vara insamlade i rena, täta behållare.
3. Förvaring av prover i *Spädningsmedel* rekommenderas INTE.
4. Låt inte faecesproverna ligga i blandningen av *spädningsmedel/konjugat* i >24 timmar.

FÖRBEREDANDANDE AV PROVER

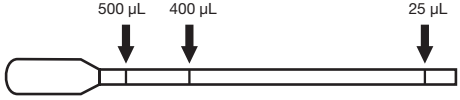
1. Ta fram alla reagenser och erforderligt antal anordningar i rumstemperatur före användning. Det rekommenderas att reagenserna tas ut ur insatsen av skumplast för att sänka tiden för uppvärmning till rumstemperatur.
2. Ställ upp ett litet provrör och sätt på en etikett för varje prov och valfria externa kontroller vid behov.
3. Använd de svarta graderade pipetterna, tillsätt 750 µL (2:a graderingen från spetsen) *spädningsmedel* i varje provrör för feacesprover. **För prover i transportmedia, t.ex. Cary Blair eller C&S ska 650 µL (1:a graderingen från spetsen) av *Spädningsmedel* tillsättas i röret.**

Provtyp	Mängd *spädningsmedel*
Färska feacesprover	750 µL (2:a graderingen från spetsen)
Frysta feacesprover (fryst outspädda)	750 µL (2:a graderingen från spetsen)
Prover i transportmedia (Cary Blair, C&S)	650 µL (1:a graderingen från spetsen)
Externa kontroller (positiv och negativ)	750 µL (2:a graderingen från spetsen)



4. Tillsätt en droppe*Konjugat* (flaska med röd kork) till varje rör.
5. Ta fram en plastpipett för engångsbruk (medföljer setet) för varje prov – pipetterna har graderingar i refief vid 25 µL, 400 µL och 500 µL.

Graderad överföringspipett:

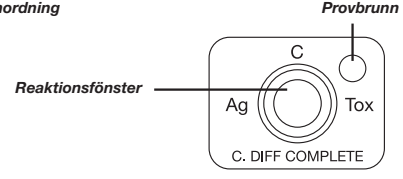


6. **Blanda alla prover noga oavsett konsistens. Det är viktigt att proverna är jämnt blandade före överföring.**
   Vätske-/halvfasta prover – pipettera 25 µL av provet med en överföringspipett och fördela i *Spädnings-/konjugat*-blandningen. Använd samma överföringspipett för att blanda det utspädda provet.
   Formade/fasta prover – Försiktighet måste vidtas för att tillsätta rätt mängd formad faeces till provblandningen. Blanda provet noga med en träapplikatorpinne och överför en liten portion prov (cirka 2 mm i diameter, motsvarande 25 µL) av provet i spädnings-/konjugatblandningen. Emulgera provet med en applikatorpinne.
   Faecesprover i Cary Blair eller C&S transportmedia - pipett 100 µL (2 droppar från överföringspipetten) av provet i *spädnings-/konjugat*-blandningen.
7. **Valfria externa kontrollprov:**
   Extern positiv kontroll - tillsätt en droppe *Positiv kontroll* (flaska med grå kork) i *Spädnings-/Konjugatblandningen*.
   Extern negativ kontroll - tillsätt 25 µL *Spädningsmedel* i *Spädnings-/Konjugatblandningen*.

OBS! Överförande av ett för litet prov eller underlåtenhet att blanda provet ordentligt i spädnings-/konjugatblandningen, kan resultera i ett falskt negativresultat. Tillsats av för mycket faecesprov kan leda till ogiltiga resultat på grund av begränsat provflöde.

TESTPROCEDUR

1. Ta fram en *Membrananordning* per prov och en anordning per valfri extern positiv eller negativ kontroll vid behov. Foliepåsarna som innehåller anordningarna ska ligga i rumstemperatur innan de öppnas. Använd anordningen omedelbart efter att påsen öppnats. Sätt en etikett på varje anordning på lämpligt sätt och placera den på ett plant underlag så att texten ”C. DIFF COMPLETE” är på anordningens undersida samt att den lilla provbrunnen är på anordningens översta högra hörn.



2. Förslut varje rör med utspätt prov och blanda noga. Ordentlig blandning kan uppnås genom centrifugering eller att vända röret upp och ner flera gånger. När ett patientprov eller en *Positiv kontroll* har spätts ut i *Spädnings-/konjugat*-blandningen kan det inkuberas till rumstemperatur i upp till 24 timmar innan det ska tillsättas till *Membrananordningen*.
3. Överför, med en ny överföringspipett, 500 µL av den utspädda prov-konjugatblandningen till ***Provbrunnen*** (mindre hål på anordningens översta högra hörn) på en *membrananordning*, genom att se till att driva ut vätskeprovet på spridningsdynan i *Membrananordningen*. När provet hälls i provbrunnen, se till att överföringspipettens spets vinklas mot *Reaktionsfönstret* (större hål anordningens mitt).
4. Inkubera anordningen i rumstemperatur i 15 minuter – provet kommer att spridas genom anordningen och ett område kommer att spridas tvärs över *Reaktionsfönstret*.
   VAR UPPMÄRKSAM PÅ PROV SOM MISSLYCKAS ATT SPRIDAS:
   Då och då misslyckas ett utspätt prov att spridas ordentligt och reaktionsfönstret blir inte helt vätt. Om reaktionsfönstret inte verkar bli helt vätt inom 5 minuter efter att provet har tillsats till provbrunnen, tillsätt 100 µL (4 droppar) av spädningsmedel till provbrunnen och vänta ytterligare 5 minuter (under totalt 20 minuter).
5. Tillsätt, efter inkubationen, 300 µL *Tvättbuffert* till ***Reaktionsfönstret*** med hjälp av den graderade vita pipetten. Låt *Tvättbufferten* rinna genom reaktionsfönstrets membran och sugas upp helt.
6. Tillsätt 2 droppar*Substrat* (flaska med vit kork) till ***Reaktionsfönstret***. Läs av och skriv ner resultaten efter 10 minuter.

TOLKNING AV RESULTAT

1. Tolkningen av testet är pålitligast när anordningen avläses omedelbart när reaktionsperioden på 10 minuter gått. Läs av anordningen på normalt arbetsavstånd i ett väl upplyst område. Titta med en synlinje rakt ovanför anordningen.
2. Granska anordningen för tecken på blå prickar i *Reaktionsfönstrets* mitt som motsvarar den interna positiva kontrollen. Tecken på någon(ra) kontrollprick(ar) motsvarar en giltig intern kontroll. Bakgrunden kan vara vit till ljusblå till färgen. Granska anordningen för tecken på blå linjer på ”Ag”- och ”Tox”-sidorna på *Reaktionsfönstret* som motsvarar testlinjerna. Linjerna kan vara bleka till mörka i intensitet.
3. **Positiva antigen (”Ag”)-resultat:** Ett positivt antigenresultat kan tolkas när som helst mellan tillsatsen av *Substrat* och avläsningstidpunkten efter 10 minuter. För ett positivt antigenresultat är den blå ”Ag”-linjen och den blåprickiga kontrollinjen synliga (bild 1a). Linjerna kan vara bleka till mörka i intensitet. En tydlig halv linje tolkas som ett positivt resultat. Tolka inte en missfärgning av membranet som ett positivt resultat. Ett positivt resultat indikerar förekomsten av *C. difficile*.
4. **Positiva antigen-och toxin (”Tox”)-resultat:** Om ett resultat är positivt (dvs. en blå ”Ag”-linje och en blåprickig kontroll under ”C” synliga), fortsätt tolkningen av toxinresultaten. Ett positivt toxinresultat kan tolkas när som helst mellan tillsatsen av *Substrat* och avläsningstidpunkten efter 10 minuter. För ett positivt toxinresultat är en blå ”Tox”-linje synligt (bild 1b). Linjen kan vara blek till mörk i intensitet. En tydlig halv linje tolkas som ett positivt resultat. Tolka inte en missfärgning av membranet som ett positivt resultat. Ett positivt resultat indikerar förekomsten av *C. difficile*-toxin.
5. **Negativa resultat:** Ett test kan inte tolkas som negativt eller ogiltigt förrän 10 minuter efter tillsatsen av *Substrat*. En enda blåprickig linje är synlig i mitten av *Reaktionsfönstret* under ”C” och inga testlinjer är synliga på *Reaktionsfönstrets* ”Ag”-och ”Tox”-sidor, (bild 1c). Ett negativt resultat i antigendelen indikerar frånvaro av *C. difficile*-antigen antingen i provet eller att det ligger under spårbarhetsgränsen för testet. Ett negativt resultat i toxindelen indikerar frånvaro av C. difficile-toxin antingen i provet eller att det ligger under spårbarhetsgränsen för testet.
6. **Ogiltiga resultat:** Inga linjer är synliga i reaktionsfönstret (bild 1d). Testresultatet är ogiltigt om ingen blåprickig linje under ”C” är synlig när reaktionstiden förflutit (bilderna 1e, 1f, 1g).
7. **Negativt antigen (”Ag”), positivt toxin (”Tox”):** En låg procentandel av prover kan ge negativt testresultat för antigen men positivt för toxin. Dessa prover ska anses obestämbara och omtestas med ett färskt prov (bild 1h). Om ett prov omtestas negativt för antigen men positivt för toxin, rapportera det som ett positivt toxinresultat.

BILD 1: *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® TOLKNING AV RESULTAT

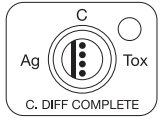


Bild 1a
Positivt antigenresultat

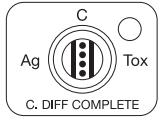


Bild 1b
Positiva antigen
-och toxinresultat

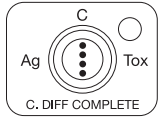


Bild 1c
Negativt resultat

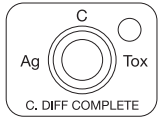


Bild 1d
Ogiltigt resultat

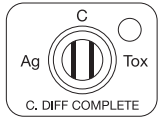


Bild 1e
Ogiltigt resultat

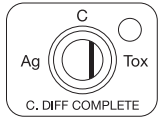


Bild 1f
Ogiltigt resultat

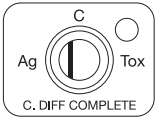


Bild 1g
Ogiltigt resultat

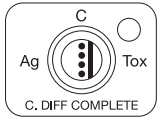


Bild 1h
Se #7 för tolkning

KVALITETSKONTROLL

Intern: En blåprickig linje måste vara synlig i mitten av *Reaktionsfönstret* under ”C” på varje *Membranordning* som testas. Synliga blå kontrollprickar bekräftar att provet och reagenser tillsats korrekt, att reagenserna var aktiva vid tidpunkten för analysen och att provet spreds ordentligt genom *Membranordningen*. Det bekräftar också andra reagensers reaktivitet i samband med analysen. En klar bakgrund i resultatområdet anses som en intern negativ kontroll. Om testet har utförts korrekt och reagenserna fungerar ordentligt blir bakgrunden vit för att ge ett urskiljbart resultat.
Extern: Reaktiviten för *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-setet ska kontrolleras vid leverans med användning av *Positiv kontroll* och negativ kontroll (*Spädningsmedel*). *Positiv kontroll* medföljer setet (flaska med grå kork). *Positiv kontroll* bekräftar andra reagensers reaktivitet i samband med analysen och är inte avsedd för säkerställande av precision vid avslutning av det analytiska testet. *Spädningsmedel* används för den negativa kontrollen. Ytterligare tester kan utföras med kontrollerna för att uppfylla de lokala, statliga och/eller federala kraven och/eller kraven från auktoriserade organisationer.

BEGRÄNSNINGAR

1. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet används för att påvisa C. difficile-antigen och toxin(er) i faecesprover. Testet bekräftar förekomst av toxin i faeces och denna information ska bedömas av en läkare i ljuset av patientens kliniska anamnes och undersökning av patienten. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet påvisar nivåer av toxin A vid ≥0,63 ng/ml, toxin B vid ≥0,16 ng/ml, och glutamatdehydrogenas vid ≥0,8 ng/ml.
2. Faecesprover är ytterst komplexa. Optimala resultat med *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet erhålls med prover som är mindre än 24 timmar gamla. De flesta outspädda prover kan lagras mellan 2 °C och 8 °C under 72 timmar innan markant försämring av toxinet observeras. Om prover inte analyseras inom denna tidsperiod kan de frysas ner och tinas upp. Upprepad nerfrysning och upptinande kan resultera i förlorad immunoreaktivitet av antigen och toxinerna A och B.
3. Vissa prover kan ge svaga reaktioner. Detta kan leda till ett antal faktorer såsom förekomst av låga nivåer av antigen och/eller toxin, förekomst av bindande ämnen eller inaktiverade enzymer i faeces. Linjerna kan vara bleka till mörka i intensitet. Dessa prover ska rapporteras som positiva om en blå linje eller ens en halv linje observeras. En tydlig halv blå linje tolkas som ett positivt resultat
4. Feacesprover bevaras i 10 % formalin, mertiolatformalin, natriumacetatformalin, eller polyvinylalkohol kan inte användas.
5. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet är kvalitativt. Färgintensiteten ska inte tolkas kvantitativt.
6. Vissa isolerade *C. sordellii* kan reagera i *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet på grund av bildande av immunologiskt besläktade toxiner (1).
7. Koloniseringsfrekvenser på upp till 50 % har rapporterats hos spädbarn. En hög frekvens har också rapporterats hos patienter med cystisk fibros (1,3). Resultat kan verka positiva hos dessa grupper men bör betraktas i kombination med risken för att vara en koloniserad bärare.
8. Den enda icke-*C. difficile*-organismen som reagerade i toxindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet var *Clostridium sordellii* VPI 9048. Denna stam bildar toxinerna HT och LT som är homologa till toxinerna A respektive B.
9. Det finns inga data på effekterna av kolonsköljning, bariumsulfatlavemang, laxeringsmedel eller tarmförberedelser prestandan på *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet. Alla dessa procedurer kan resultera i omfattande utspädning eller förekomst av tillsatser som kan påverka testresultatet.

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Sjukdomen *Clostridium difficile* är framförallt en nosokomial sjukdom bland äldre patienter och sjukdomens frekvens är beroende på faktorer som patientpopulation, typ av institution och epidemiologi. Den rapporterade frekvensen av sjukdomen *C. difficile* hos patienter med antibiotikarelaterad diarré kan variera från 5 till 20 % och sjukhus kan erfara en lägre eller högre frekvens. Det är viktigt att betrakta alla testresultat tillsammans med kliniska symtom eftersom en del friska vuxna och ett stort antal friska spädbarn (upp till 50 %) kommer att vara positiva för *C. difficile*-toxin. Dessutom har bärarfrekvensen för *C. difficile* på 22 % till 32% rapporterats hos patienter med cystisk fibros (1,3). I studier som utförts för denna anordning på symtomatiska patienter var incidensen för toxinerna A och B 12 % och GDH 18 %. Ett positivt resultat i antigendelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet bekräftar förekomst av *C. difficile* i ett faecesprov; ett negativt resultat indikerar frånvaro av organismen. Ett positivt resultat i toxindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet bekräftar förekomst av *C. difficile*-toxin i ett faecesprov; ett negativt resultat indikerar frånvaro av toxin eller otillräckliga nivåer av toxin för spårbarhet.

PRESTANDAEGENSKAPER

Klinisk utvärdering av antigendelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet
Antigendelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet jämfördes med bakterieodling. Prover som ingick i utvärderingen skickades till kliniska laboratorier för rutinmässig undersökning. Bakterieodlingstestet utfördes enligt rutiner på inrättningen. Resultaten visas i tabell 1.

Tabell 1. Sammanfattning av klinisk prestanda i jämförelse av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet med bakterieodling

n = 1126	Bakterieodling Positiv	Bakterieodling Negativ
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Positiv antigenlinje	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Negativ antigenlinje	21	842

		95 % tillförlitlighets-gränser
Känslighet	90,5 %	85,7 – 93,9
Specificitet	93,1 %	91,2 – 94,7
Förutspått positivt värde	76,4 %	70,7 – 81,3
Förutspått negativt värde	97,6 %	96,2 – 98,4
Samband	92,6 %	91,8 – 93,4

Avvikande prover utvärderades med användning av ELISA-test för *C. difficile* glutamatdehydrogenasantigen.
Tjugonio av de 62 falskt positiva proverna var positiva av ett annat GHD-test och ansågs sant positiva.
Tretton av de 21 falskt negativa proverna var negativa av ett annat GHD-test och ansågs sant negativa.

Antigendelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testet jämfördes med vävnadsodlingsanalys för spårbarhet för C. difficile-toxin. Prover som ingick i utvärderingen skickades till kliniska laboratorier för rutinmässig undersökning. Resultaten visas i tabell 2. Antigendelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testet påvisade 98,7 % av vävnadsodlingspositiva prov.

Tabell 2. Sammanfattning av klinisk prestanda i jämförelse av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testet med vävnadsodlingsanalys

n = 1126	Vävnadsodling Positiv	Vävnadsodling Negativ
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Positiv antigenlinje	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Negativ antigenlinje	2	861

Klinisk utvärdering av toxindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testet
Toxindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testet jämfördes med vävnadsodlingsanalys vid två kliniska laboratorier och på TECHLAB®, Inc. Prover som ingick i utvärderingen skickades till kliniska laboratorier för rutinmässig undersökning. Resultaten visas i tabell 3.

Tabell 3. Sammanfattning av klinisk prestanda i jämförelse av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testet med vävnadsodlingsanalys

n = 1126	Vävnadsodling Positiv	Vävnadsodling Negativ
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Positiv toxinlinje	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Negativ toxinlinje	19	964

		95 % tillförlitlighetsgränser
Känslighet	87,8 %	81,4 - 92,3
Specificitet	99,4 %	98,6 - 99,7
Förutspått positivt värde	95,8 %	90,7 - 98,3
Förutspått negativt värde	98,1 %	96,9 - 98,8
Samband	97,8 %	97,6 - 98,0

Avvikande prover utvärderades med användning av ELISA-test för toxinerna A och B.
Fem av de 6 falskt positiva proverna var positiva med ELISA och ansågs sant positiva.
Tolv av de 19 falskt negativa proverna var negativa med ELISA och ansågs sant negativa.

EFFEKT AV KONSISTENS PÅ FEACESPROV

Effekt av konsistens på faecesprov på *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testet
Reaktionen för feacesprover av varierande konsistens i antigendelen (n=978) och toxindelen (n=981) av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testet visas i tabellerna 4 och 5. Procentandelen av positiva reaktioner med användning av odlingsanalys eller *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testet var lika i alla tre typerna av faecesprover (vätska, halvfast och fast). Alla proverna skickades för C. difficile-test. Grunden till skickandet av proverna var patientens kliniska anamnes och inte provets konsistens. I antigendelen visade resultaten att *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testet utfördes på samma sätt som bakterieodling vid test av prover av olika konsistens. I toxindelen visade resultaten att *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testet utfördes på samma sätt som vävnadsodlingsanalys vid test av prover av olika konsistens.

Tabell 4. Reaktion av feacesprover av varierande konsistens på antigendelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*-testet

Antal prover (n = 978)	Flytande prover (n = 335)	Halvfasta prover (n = 522)	Fasta prover (n = 121)
Positiv genom bakterieodlingsanalys	59 (17,6 %)	110 (21,1 %)	19 (15,7 %)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Positiv antigenlinje	72 (21,5 %)	128 (24,5 %)	25 (20,7 %)
Negativ genom bakterieodlingsanalys	276 (82,4 %)	412 (78,9 %)	102 (84,3 %)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Negativ antigenlinje	263 (78,5 %)	394 (75,5 %)	96 (79,3 %)

Tabell 5. Reaktion av feacesprover av varierande konsistens på toxindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet

Antal prover (n = 981)	Flytande prover (n = 336)	Halvfasta prover (n = 523)	Fasta prover (n = 122)
Positiv genom vävnadsodlingsanalys	43 (12,8 %)	81 (15,5 %)	8 (6,6 %)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Positiv toxinlinje	42 (12,5 %)	72 (13,8 %)	7 (5,7 %)
Negativ genom vävnadsodlingsanalys	293 (87,2 %)	442 (84,5 %)	114 (93,4 %)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Negativ toxinlinje	294 (87,5%)	451 (86,2 %)	115 (94,3 %)

ANALYTISK KÄNSLIGHET

Avslutningen för analysen fastställdes vid koncentrationer på 0,63 ng/ml för toxin A, 0,16 ng/ml för toxin B och 0,8 ng/ml för glutamatdehydrogenas.

REPRODUCERBARHET

Reproducerbarheten för *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETEE*®-testet fastställdes med 12 feacesprover som kodades för att förhindra identifiering under testet. Testet utfördes vid 3 oberoende laboratorier som testade proverna i 3 dagar. Proverna gav de förväntade resultaten 100 % av tiden.

KORSREAKTIVITET

Faecesprover inokulerade med följande mikroorganismer till en slutlig koncentration på cirka 10^8 eller fler organismer per ml reagerade inte i antigen-eller toxindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETEE*®-testet:
Bakterie eller Patogen: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (icke-toxigen)*, Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC*, Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7*, Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans)*, Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*
Den enda icke-*C. difficile*-organismen som reagerade i toxindelen av *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet var *Clostridium sordellii* VPI 9048. Denna stam bildar toxinerna HT och LT som är homologa till toxinerna A respektive B.
Följande virus på $10^{3.3}$ to $10^{8.25}$ TCID-enheter per 0,2 ml reagerade inte i *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet:
Virus: Adenovirus av typerna 1, 2, 3, 5, 40, 41, humant coronavirus, coxsackievirus B2, B3, B4, B5, echovirus 9, 11, 18, 22, 33, enterovirus typ 68, 69, 70, 71, rotavirus.

STÖRANDE ÄMNEN

Följande ämnen (USA formulering) hade ingen effekt på testresultaten vid förekomst i faeces i angivna koncentrationer: mucin (3,5 % vikt/vol), humanblod (40 % vol/vol), bariumsulfat (5 % vikt/vol), Imodium® (5% vol/vol), Kaopectate® (5 % vol/vol), Pepto-Bismol® (5 % vol/vol), stearin-/palmitinsyra (40 % vikt/vol), metronidazol (0,25 % vikt/vol), vankomycin (0,25 % vikt/vol).

REAKTION PÅ KLINISKA ISOLERAT ERHÅLLNA PÅ CYKLOSERIN-CEFOXITIN-FRUKTOS-AGAR (CCFA)

Totalt 103 kliniskt isolerade *C. difficile* som erhölls genom anaerob bakterieodling på CCFA efter 3 dagar vid 37 °C testades i *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®-testet. För analysen valdes och blandades individuella kolonier i *Spädningsmedel* som rekommenderas för feacesprover. Alla 103 isolater gav en positiv antigenreaktion i testet.
Sjuttio av de 103 isolaterna (68 %) var från feacesprover som var positiva för *C. difficile* -toxin genom vävnadsodlingsanalys. Av dessa gav 56 (80 %) en positiv toxinreaktion vid undersökning efter anaerob växt på CCFA under 3 dagar vid 37 °C.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

KULLANIM AMACI

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*, tek bir reaksiyon kanalında *Clostridium difficile* glutamat dehidrojenaz antijeni ile A ve B toksinlerinin eşzamanlı olarak algılanmasında kullanılan hızlı bir membran enzimi bağışıklık testidir. Test, *C. difficile* hastalığı olduğundan şüphelenilen kişilerden alınan dışı örneklerinde A ve B toksinleri arayarak toksijen *C. difficile* varlığını doğrulamakta ve *C. difficile* varlığını test ederek *C. difficile* antijeni, glutamat dehidrojenazı bulunup bulunmadığını algılamaktadır. Test, *C. difficile* hastalığının teşhisinde yardımcı bir araç olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Diğer *C. difficile* testleri gibi, sonuçlar hasta geçmişi göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir.

AÇIKLAMA

Antibiyotik tedavisi sonrasında, çoğu hastada gastrointestinal sorunlar görülmektedir ve bunlar orta şiddette diyareden, şiddetli psödomembranöz kolite kadar geniş bir aralıkta değişmektedir. Çoğu durumda, gastrointestinal hastalıkların orta şiddette olan biçimleri ile birçok psödomembranöz kolit rahatsızlığı toksijen *Clostridium difficile* türlerinden kaynaklanmaktadır (1). Bu organizma, normal flora antibiyotik ile değiştiğinde bağırsak içerisinde gelişen fırsatçı bir anaerobik bakteridir. Toksijen *C. difficile* türleri, toksinleri kodlayan genler taşırken, toksijen olmayan türler toksin genleri taşımaz. Hastalık başlangıcı, toksijen organizmalar tarafından üretilen toksinlerle ilgilidir. Hastalık ile ilişkili klinik belirtilerin birincil olarak dokulara hasar veren bir enterotoksin olan A toksini ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır (2,3). *C. difficile* aynı zamanda B toksini adı verilen bir toksin daha üretmektedir. Organizmanın sitotoksini olarak bilinen B toksini, mevcut durumda çoğu laboratuvarda kullanılan doku kültürü testleri tarafından algılanabilmektedir. Toksijen *C. difficile* türleri ya bu iki toksini birden üretmekte ya da yalnızca B toksini üretmektedir (4-7). *C. difficile* glutamat dehidrojenazı dışkıdaki organizmalar için iyi bir antijen göstergesidir, çünkü toksijen olan ya da olmayan tüm türler tarafından üretilmektedir (8-10). Dışkı örneklerindeki antijen *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* testi kullanılarak saptanabilir. *C. difficile* glutamat dehidrojenazı açısından pozitif sonuç veren testler, dışkı örneğinde bu organizmanın bulunduğunu doğrularken, negatif bir sonuç bu organizmanın mevcut olmadığını gösterir. A ve B toksinleri için gerçekleştirilen testin pozitif sonuç vermesi halinde, toksijen *C. difficile* bulunduğu doğrulanmış olur.

TEST PRENSİBİ

C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® testi özel olarak *C. difficile* glutamat dehidrojenaz ile A ve B toksinlerine özel antikorlar kullanılmaktadır. Cihaz, üç adet dikey immobilize antikor çizgisi ile bir adet Reaksiyon Bölmesi bulunmaktadır. Antijen test çizgisi ("Ag") *C. difficile* glutamat dehidrojenaz antikorları içermektedir. Kontrol çizgisi ("C") horseradish peroksidazı (HRP) antikorları içeren bir kesik çizgidir. A ve B toksinleri test çizgisi ("Tox") *C. difficile* A ve B toksinlerinin antikorlarını içermektedir. *Konjugat* glutamat dehidrojenaz, A ve B toksinleri ile horseradish peroksidazı antikorları içermektedir. Testi gerçekleştirmek için, örneğin *Seyreltici* ve *Konjugat* karışımı içeren bir tüpe konulması gerekmektedir. Seyreltilmiş örnek - konjugat karışımı *Örnek Çukuruna* eklenir ve cihazın 15 dakika boyunca oda sıcaklığında enkübe olması beklenir. Enkübasyon sırasında, örnek içerisindeki glutamat dehidrojenaz ile A ve B toksinleri, antikor-peroksidaz konjugatlarına bağlanır. Antijen-antikor-konjugat kompleksleri bir filtre süzgeci içerisinden membrana doğru ilerler ve burada immobilize glutamat dehidrojenaza özel antikor çizgisi ile A ve B toksinlerine özel antikor çizgisi tarafından yakalanır. Bunun ardından, *Reaksiyon Bölmesi Yıkama Tamponu* ile yıkanır ve *Substrat* eklenir. 10 dakikalık enkübasyon dönemi sonrasında, *Reaksiyon Bölmesinin* "Ag" bölümünde dikey mavi çizgi görüntülenip görüntülenmediğine bakılarak "Ag" reaksiyonu görsel olarak doğrulanır. Mavi çizgi, test sonucunun pozitif olduğunu gösterir. "Ag" pozitif olduğunda, *Reaksiyon Bölmesinin* "Tox" bölümünde dikey mavi çizgi görüntülenip görüntülenmediğine bakılarak "Tox" reaksiyonunu görsel olarak doğrulanır. Mavi çizgi, test sonucunun pozitif olduğunu gösterir. *Reaksiyon Bölmesinin* "C" kısmı altında dikey mavi kesik çizgi ile gösterilen pozitif "C" reaksiyonu, testin doğru şekilde çalıştığını ve sonuçların geçerli olduğunu doğrular.

ÜRÜNLE BİRLİKTE VERİLEN MATERYALLER

MEM | DEV — ***Membran Cihazları*** – her kesede 1 cihaz bulunur

DIL | SPE — ***Seyreltici* (her bir şişede 22 mL)** – Kademeli damlalık tertibatı bulunan tamponlu protein solüsyonu (%0,05 ProClin® 300 içerir)*

WASH | REAG — ***Yıkama Tamponu* (her bir şişede 12 mL)** – Kademeli damlalık tertibatı bulunan tamponlu solüsyon (%0,05 ProClin® 300 içerir)*

SUBS | REAG — ***Substrat* (her bir şişede 3,5 mL)** – Tetrametilbenzidin içeren solüsyon

CONJ | ENZ — ***Konjugat* (her bir şişede 2,5 mL)** – Horseradish peroksidaz ile birleşmiş olan glutamat dehidrojenaza özel fare monoklonal antikoru ile tamponlu bir protein solüsyonu içinde horseradish peroksidaz ile birleşmiş olan A ve B toksinlerine özel keçi poliklonal antikorları (%0,05 ProClin® 300 içerir)*

CONTROL | + — ***Pozitif Kontrol* (2 mL)** – Tamponlu protein solüsyonu içerisinde antijen

Tek kullanımlık plastik aktarım pipetleri – 25 µL, 400 µL ve 500 µL ölçekli

IVD — *In vitro* tanısal kullanım için

*İşaret Sözcüğü: Uyarı
H317: Alerjik deri reaksiyonuna sebep olabilir
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

GEREKLİ OLAN ANCAK ÜRÜNLE BİRLİKTE VERİLMEYEN MATERYAL VE EKİPMANLAR

Küçük test tüpleri (örn. plastik Eppendorf tüpleri ya da cam tüpler)
Uygulama çubukları *Zamanlayıcı* *Vorteks karıştırıcı*
Dışkı örnekleri ile ilgilenirken kullanılacak tek kullanımlık eldivenler *Pipet cihazı ve uçları*

RAF ÖMRÜ VE SAKLAMA

Kitin son kullanım tarihi etiket üzerinde verilmiştir. Her bir bileşenin son kullanım tarihi, bileşen etiketlerinde verilmiştir. Kit 2°C ila 8°C arası sıcaklıkta saklanmalıdır.

ÖNLEMLER

1. Farklı kitlerin ayıraçları karıştırılmamalı ya da dönüşümlü olarak kullanılmamalıdır. Son kullanım tarihi geçmiş kitleri kullanmayın.
2. Kit içerisindeki her bir bileşen, sızıntı emarelerine karşı kontrol edilmelidir. Teslim alındığında, kiti kontrol ederek bileşenlerin uygunsuz nakliye koşulları nedeniyle donmuş ya da ısınmış olup olmadığına bakın.
3. KULLANIM ÖNCESİNDE tüm bileşenleri ODA SICAKLIĞINA getirin!
4. Kapaklar, uçlar ve damlalık tertibatları renklerle işaretlenmiştir, bunları KARIŞTIRMAYIN ya da birbirinin yerine KULLANMAYIN!

TR

5. Ayıraçları dondurmayın. Kit 2°C ila 8°C arası sıcaklıkta saklanmalıdır.
6. *Membran Cihazını* içeren kese açılmadan önce oda sıcaklığında olmalıdır. Kullanım öncesinde membran cihazlarının kuru olmasına dikkat edin.
7. En iyi sonuçları elde etmek için 72 saat içerisinde topladığınız dışkı örneklerini kullanın. Donmuş örnekler, donma ve çözünme nedeniyle aktifliğini kaybedebilir. Donmuş örnek kullanacaksanız, örnekleri oda sıcaklığında çözün.
8. Ayıraçları hazırlarken damla boyutunun tutarlı, hacmin de doğru olmasını sağlamak için ayıraç şişelerini dikey tutun.
9. Örnekler ile membran cihazları biyolojik tehlike içeren madde gibi kullanılmalı ve kullanım sonrasında da bu şekilde atılmalıdır.
10. Membran cihazları yeniden kullanılamaz.
11. Test hassasiyet ve özgüllük açısından optimize edilmiştir. Belirtilen prosedür ve/veya test koşullarında değişiklik olması, testin hassasiyetini ve özgüllüğünü etkileyebilir. Belirtilen prosedürün dışına çıkmayın.
12. Birden fazla dışkı örneğini test ederken toplam test süresine dikkat edin. Önce *Seyreltici* ekleyin ve ardından her bir *Seyreltici* tüpüne *Konjugat* ekleyin. Daha sonra, *Seyreltici/Konjugat* tüpüne örneği ekleyin. Seyreltilmiş örnekleri iyice karıştırın ve *Membran Cihazına* aktarın. 15 dakikalık enkübasyon aşaması, en son seyreltilmiş olan örnek-konjugat karışımı son *Membran Cihazına* eklendikten sonra başlar.
13. *Substrat* ayıracı koyu mavi/mor bir renk alırsa, değiştirilmesi için teknik servisi arayın.
14. Dışkı örnekleri, potansiyel olarak bulaşıcı maddeler içerebilir ve CDC/NIH Kılavuzu "Mikrobiyolojik ve Biyomedikal Laboratuvarlarda Biyogüvenlik" içerisinde önerilen şekilde "2. Seviye Biyogüvenlik" tedbirleri çerçevesinde kullanılmalıdır.
15. Tüm ayıraçlar, yalnızca *in vitro* tanısal kullanım içindir.
16. Testi gerçekleştirirken tek kullanımlık eldiven takın.
17. Ayıraç, koruyucu olarak %0,05 ProClin® 300 içerir. Derişiminin düşük olmasına rağmen, ProClin® 300'ün zararlı olduğu bilinmektedir. Deride tahriş ya da kızarıklık meydana gelirse tıbbi /tavsiye yardım alın. Kontamine olan elbiseleri çıkarın ve tekrar kullanmadan önce yıkayın. Ayıraçlarla ilgili işlemlerde mevcut laboratuvar güvenliği yönetmeliklerine ve iyi laboratuvar uygulamalarına riayet edin. Bu ürünün Güvenlik Veri Kağıtları talep üzerine temin edilebilir; teknik desteğe başvurun.
18. Atık bertaraf yönetmeliklerine dair ulusal, bölgesel ve yerel kurallara uyun.

DIŞKI ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI, SAKLANMASI VE KULLANILMASI

Kabul Edilebilir Örnek Türleri
Taze Dışkı Örnekleri
Donmuş Dışkı Örnekleri
Nakliye aracı (Cary Blair, C&S) içerisinde tutulan örnekler

Kullanmayın
Formalin bazlı fiksatiflerde (örn. sodyum asetat formalin, %10 formalin, mertiolat formalin) tutulan dışkı örnekleri
Alkol bazlı fiksatiflerde (örn. polivinil alkol) içerisinde tutulan dışkı örnekleri

Örnek Saklama Sıcaklık	Kabul edilebilir saklama süresi uzunluğu	Yorumlar
2°C – 8°C	72 saat	İdeal örnekler 24 saatten daha kısa süre saklanmış olanlardır
Donmuş ≤ -10°C	72 saatten daha uzun süre	Oda sıcaklığında çözün. Birden fazla donma ve çözünme, toksin bozunması nedeniyle örnek aktifliğinde kayıp görülmesine neden olabilir.

1. Dışkı örnekleri için kurum içinde kullanılan standart toplama ve işleme prosedürleri uygundur.
2. Dışkı örnekleri temiz ve sızdırmaz kaplara alınmalıdır.
3. Dışkı örneklerinin *Seyreltici* içerisinde saklanması ÖNERİLMEZ.
4. Dışkı örneklerinin 24 saatten daha uzun süre *Seyreltici/Konjugat* içerisinde kalmasına izin vermeyin.

ÖRNEK HAZIRLAMA

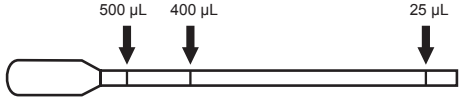
1. Kullanım öncesinde tüm ayıraçları ve istenilen cihaz sayısını oda sıcaklığına getirin. Ayıraçların oda sıcaklığına gelmesi için gereken süreyi azaltmak amacıyla reaktifleri köpük koruyucudan çıkarmanız önerilir.
2. Her bir örnek için küçük bir test tüpü ayırın ve etiketleyin, gerekli olduğunda bunları harici kontroller için de gerçekleştirin.
3. Siyah ölçekli damlalık tertibatını kullanarak, dışkı örnekleri için her bir tüpe 750 µL (uçtan 2. ölçek) *Seyreltici* ekleyin. **Cary Blair ya da C&S gibi nakliye araçları içerisinde örnekler için tüpe 650 µL *Seyreltici* ekleyin (ucun 1. kademesinden).**

Örnek Türü	*Seyreltici* Hacmi
Taze Dışkı Örnekleri	750 µL (uçtan 2. ölçek)
Donmuş Dışkı Örnekleri (donmuş ve seyreltilmemiş)	750 µL (uçtan 2. ölçek)
Nakliye aracı (Cary Blair, C&S) içerisinde tutulan örnekler	650 µL (ucun 1. kademesinden)
Harici Kontroller (pozitif ve negatif)	750 µL (uçtan 2. ölçek)



4. Her bir tüpe bir damla *Konjugat* (kırmızı kapaklı şişe) ekleyin.
5. Her bir örnek için bir adet tek kullanımlık plastik transfer pipeti (kitle birlikte verilmiştir) alın - pipetlerin 25 µL, 400 µL ve 500 µL olarak artan ölçekleri vardır.

Ölçekli Aktarım Pipeti:



6. **Kıvama bakmadan tüm örnekleri iyice karıştırın- aktarım öncesinde örneklerin eşit derecede karışmış olması gerekmektedir.**
   Sıvı/Yarı-katı örnekler – bir aktarım pipeti ile 25 µL örnek alın ve *Seyreltici/Konjugat* karışımına ekleyin. Seyreltilmiş örneği karıştırmak için aynı aktarım pipetini kullanın.
   Sekilli/Katı örnekler – Örnek karışımına doğru miktarda şekilli dışkı eklenmesi için dikkatli olunması gerekmektedir. Örneği ahşap bir uygulama çubuğu kullanarak iyice karıştırın ve az miktarda (yaklaşık 2 mm çaplı, 25 µL miktarda) örneği Seyreltici/Konjugat karışımına aktarın. Uygulama çubuğunu kullanarak örneği emülsiyon haline getirin.
   Cary Blair ya da C&S nakliye araçları içerisindeki dışkı örnekleri - pipet kullanarak 100 µL (aktarım pipetinden 2 damla) örneği *Seyreltici/Konjugat* karışımına alın.

7. **Opsiyonel Harici Kontrol Örnekleri:**
Harici Pozitif Kontrol - *Seyreltici/Konjugat* karışımına bir damla *Pozitif Kontrol* (gri kapaklı şişe) ekleyin.
Harici Negatif Kontrol - *Seyreltici/Konjugat* karışımına 25 µL *Seyreltici* ekleyin.

NOT: Çok az örnek aktarılması ya da örneğin karıştırılmaması veya Seyreltici/Konjugat karışımında yeteri kadar bekletilmemesi, yalancı negatif test sonucu alınmasına neden olabilir. Çok fazla dışkı örneği eklenmesi, kısıtlı örnek akışı nedeniyle geçersiz sonuçlar alınmasına neden olabilir.

TEST PROSEDÜRÜ

1. Örnek başına bir *Membran Cihazı* alın ve gerekli olduğunda, opsiyonel harici pozitif veya negatif kontrol için bir cihaz alın. Cihazların içerisinde olduğu folyolar açılmadan önce oda sıcaklığına getirilmelidir. Cihazı folyoyu açar açmaz kullanın. Her bir cihazı uygun şekilde etiketleyin ve düz bir yüzey üzerinde, "C. DIFF COMPLETE" yazısı aşağı, küçük Örnek Çukuru da cihazın sağ üst köşesine gelecek şekilde tutun.

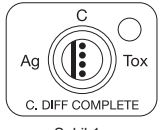


2. Her bir seyreltilmiş örnek tüpünü kapatın ve iyice karıştırın. Tüpü girdap oluşturacak şekilde çalkalamak ya da yukarı aşağı çevirmek suretiyle uygun karışım elde edilebilir. Hasta örneği ya da *Pozitif Kontrol Seyreltici/Konjugat* karışımı içerisinde seyreltildikten sonra, *Membran Cihazına* eklenmeden önceki 24 saatlik döneme kadar oda sıcaklığında enkübe edilebilir.
3. Yeni bir aktarım pipeti kullanarak 500 µL seyreltilmiş örnek-konjugat karışımını *Membran Cihazının* ***Örnek Çukuruna*** (cihazın sağ üst köşesindeki küçük delik) ekleyin, bu sırada sıvı örneğin *Membran Cihazı* içindeki emme bölümüne geçmesine özen gösterin. Örneği, örnek çukuruna alırken, aktarım pipetinin uç kısmının *Reaksiyon Bölmesine* (cihazın orta kısmındaki büyük delik) doğru bir açıda olduğundan emin olun.
4. Cihazı 15 dakika boyunca oda sıcaklığında enkübe edin – örnek cihaz tarafından emilecek ve ıslak alan *Reaksiyon Bölmesi* boyunca yayılacaktır.
DAĞILMAYAN ÖRNEKLER İÇİN NOT:
Bazı durumlarda, seyreltilmiş bir örnek uygun şekilde dağılmaz ve Reaksiyon Bölmesi tamamen ıslanmaz. Reaksiyon Bölmesi, örnek, Örnek Çukuruna eklendikten sonraki 5 dakika içerisinde tamamen ıslanmazsa, Örnek Çukuruna 100 µL (4 damla) Seyreltici ekleyin ve 5 dakika daha bekleyin (toplam 20 dakika).
5. Enkübasyon sonrasında, ölçekli damlalık tertibatını kullanarak, 300 µL *Yıkama Tamponunu* ***Reaksiyon Bölmesine*** ekleyin. *Yıkama Tamponunun* Reaksiyon Bölmesi membranından geçmesini ve tamamen emilmesini bekleyin.
6. ***Reaksiyon Bölmesine*** 2 damla *Substrat* (beyaz kapaklı şişe) ekleyin. 10 dakika sonra sonuçları görsel olarak gözlemleyin ve kaydedin.

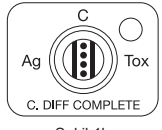
SONUÇLARIN YORUMLANMASI

1. Cihaz 10 dakikalık reaksiyon süresi bittikten hemen sonra incelendiğinde, test en güvenilir şekilde yorumlanır. Cihazı, normal çalışma mesafesinde, iyi ışıklandırılmış bir alanda gözlemleyin. Doğrudan cihazın üzerinden bakın.
2. Dahili pozitif kontrolü temsil eden şekilde *Reaksiyon Bölmesinin* orta kısmında mavi noktalar olup olmadığına bakın. Kontrol noktasının/noktalarının görüntülenmesi, geçerli bir dahili kontrol olduğunu gösterir. Arka plan, açık mavi renkte görülebilir. *Reaksiyon Bölmesinin* test çizgilerini temsil eden "Ag" ve "Tox" kısımlarında mavi çizgi olup olmadığına bakın. Çizgiler yoğunluğa bağlı olarak açık veya koyu olarak görüntülenebilir.
3. **Pozitif Antijen ("Ag") Sonucu:** Pozitif bir antijen sonucu *Substrat* eklenmesinden 10 dakikalık test değerlendirme süresinin sonuna kadarki süreçte herhangi bir noktada yorumlanabilir. Pozitif bir antijen sonucunda, mavi "Ag" çizgisi ve "C" bölümündeki kesik mavi kontrol çizgisi görüntülenir (Şekil 1a). Çizgiler yoğunluğa bağlı olarak açık veya koyu olarak görüntülenebilir. Net bir kısmı çizgi pozitif sonuç olarak yorumlanır. Membran renk değişimini pozitif sonuç olarak yorumlamayın. Pozitif sonuç, *C. difficile* bulunduğunu gösterir.
4. **Pozitif Antijen ve Toksin ("Tox") Sonucu:** Antijen sonucu pozitifse ("Ag" çizgisinde mavi bir çizgi, "C" bölümü altında da kesik mavi kontrol çizgisi görüldüğünde) toksin sonucu yorumu için ilerleyin. Pozitif bir toksin sonucu *Substrat* eklenmesinden 10 dakikalık test değerlendirme süresinin sonuna kadarki süreçte herhangi bir noktada yorumlanabilir. Pozitif bir toksin sonucunda, mavi bir "Tox" çizgisi görülür (Şekil 1b). Çizgi yoğunluğa bağlı olarak açık veya koyu olarak görüntülenebilir. Net bir kısmı çizgi pozitif sonuç olarak yorumlanır. Membran renk değişimini pozitif sonuç olarak yorumlamayın. Pozitif sonuç, *C. difficile* toksini bulunduğunu gösterir.
5. **Negatif Sonuç:** Test, *Substrat* eklenmesinden sonraki 10 dakika öncesinde negatif ya da geçersiz olarak yorumlanamaz. *Reaksiyon Bölmesinin* orta kısmında, "C" bölümünün altında tek bir kesik mavi çizgi göründüğünde ve *Reaksiyon Bölmesinin* "Ag" veya "Tox" kısmında test çizgisi görülmediğinde (Şekil 1c). Antijen kısmında negatif sonuç alınması *C. difficile* antijeninin bulunmadığını ya da test saptama seviyesinin altında olduğunu gösterir. Toksin kısmında negatif sonuç alınması C. difficile toksininin bulunmadığını ya da test saptama seviyesinin altında olduğunu gösterir.
6. **Geçersiz Sonuç:** Reaksiyon Bölmesinde görünür çizgi olmaması (Şekil 1d). Reaksiyon süresinin sonunda "C" bölümünün alt kısmında mavi kesik çizgi olmadığında, test sonucu geçersizdir (Şekil 1e, 1f, 1g).
7. **Negatif Antijen ("Ag"), Pozitif Toksin ("Tox"):** Çok az örnekte, antijen testi negatif çıkabilirken, toksin testi pozitif olabilir. Bu örnekler, belirsiz olarak değerlendirilmeli ve taze bir örnek kullanılarak test yinelenmelidir (Şekil 1h). Yeniden yapılan testte de antijen sonucu negatif, toksin sonucu pozitif olduğunda, bu durumu pozitif toksin sonucu olarak rapor edilmelidir.

ŞEKİL 1: *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® SONUÇLARIN YORUMLANMASI



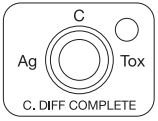
Şekil 1a
Pozitif Antijen Sonucu



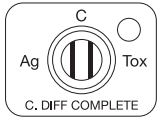
Şekil 1b
Pozitif Antijen
ve Toksin Sonucu



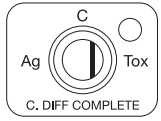
Şekil 1c
Negatif Sonuç



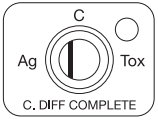
Şekil 1d
Geçersiz Sonuç



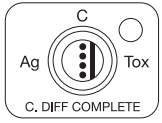
Şekil 1e
Geçersiz Sonuç



Şekil 1f
Geçersiz Sonuç



Şekil 1g
Sonuç



Şekil 1h
Yorum için bkz. #7

KALİTE KONTROLÜ

Dahili: Test edilen tüm *Membran Cihazlarında*, *Reaksiyon Bölmesinin* ortasında "C" kısmında kesik mavi bir çizgi görülmelidir. Mavi kontrol çizgileri, örnek ve ayıraçların doğru şekilde eklendiğini, ayıraçların test sırasında aktif olduğunu ve örneğin *Membran Cihazı* boyunca düzgün şekilde dağıldığını doğrular. Aynı zamanda, test ile ilişkili diğer ayıraçların reaktifliğini de doğrular. Sonuç alanının arka planının berrak olması, dahili negatif kontrol olarak görülür. Test doğru şekilde yapılmışsa ve ayıraçlar doğru şekilde çalışıyorsa, arka plan görülebilir bir sonuç verecek şekilde beyaz olacaktır.
Harici: *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® kitinin reaktifliği, teslimat sonrasında *Pozitif Kontrol* ve negatif kontrol (*Seyreltici*) kullanılarak doğrulanmalıdır. *Pozitif Kontrol* kit ile birlikte verilmektedir (gri kapaklı şişe). *Pozitif Kontrol* test ile ilişkili diğer ayıraçların reaktifliğini test eder ve analitik test geçirimi hassaslığını sağlamak üzere tasarlanmamıştır. *Seyreltici* negatif kontrol için kullanılır. Yerel, devlet ve/veya federal yönetmelikleri ve/veya akreditasyon kurumlarının gerekliliklerini karşılamak için ilave testler yapılabilir.

SINIRLAMALAR

1. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testi, dışkı örneklerinde C. difficile antijen ve toksinlerinin saptanması için kullanılır. Test, dışkıdaki toksin varlığını doğrular ve bu bilgi, doktor tarafından hastanın klinik geçmişi ve fiziksel muayene sonuçlarının ışığında yorumlanmalıdır. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®testi, şu seviyelerde saptama yapacaktır: A toksini: ≥0,63 ng/mL, B toksini: ≥0,16 ng/mL, ve glutamat dehidrojenaz: ≥0,8 ng/mL.
2. Dışkı örnekleri son derece komplekstir. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinden en iyi sonuçları almak için en geç 24 saat içerisinde toplanmış örneklerin kullanılması gerekmektedir. Birçok seyreltilmemiş örnek, toksinde büyük oranda bozunma görünmeden 2°C ila 8°C arası sıcaklıkta 72 saat saklanabilir. Örnekler bu süre içerisinde test edilmediğinde, dondurulabilir ya da çözülebilir. Ancak, dondurma ve çözme işlemleri arka arkaya gerçekleştirildiğinde antijen ile A ve B toksinleri immünreaktivitesinde kayıp olabilir.
3. Bazı örnekler zayıf reaksiyon verebilir. Bu birkaç faktörden kaynaklanıyor olabilir; düşük antijen ve/veya toksin seviyeleri , bağlayıcı maddelerin bulunması veya dışkıda inaktive edici enzimler olması. Çizgiler yoğunluğa bağlı olarak açık veya koyu olarak görüntülenebilir. Kısmi bile olsa herhangi bir mavi çizgi gözlemlendiğinde, bu örnekler pozitif olarak rapor edilmelidir. Net bir kısmı mavi çizgi pozitif sonuç olarak yorumlanır.
4. %10 Formalin, mertiolat formalin, sodyum asetat formalin ya da polivinil alkolde saklanan dışkı örnekleri kullanılamaz.
5. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testi nitel bir testtir. Rengin yoğunluğu nicel olarak yorumlanmamalıdır.
6. İmmünolojik olarak ilgili toksinlerin üretimi nedeniyle *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinde *C. sordellii* reaktivitesi de görülebilir (1).
7. Bebeklerde %50'ye kadar kolonizasyon oranı rapor edilmiştir. Kistik fibroz hastalarında da yüksek bir oran rapor edilmiştir (1, 3). Bu gruplarda, sonuçlar pozitif görülebilir ancak testler kolonize taşıyıcı olma potansiyeli çerçevesinde değerlendirilmelidir.
8. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testi toksin bölümünde reaksiyon gösteren tek *C. difficile* dışı organizma *Clostridium sordellii* VPI 9048'dir. Bu tür, sırasıyla A ve B toksinleri ile homolog olan HT ve LT toksinlerini üretir.
9. Kolonik yıkama, baryum lavmanı, laksatifler ya da bağırsak preparatlarının *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testi performansına etkisi ile ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu prosedürler aşırı seyreltmeye ya da örnekte test performansını etkileyebilecek katkı maddelerinin bulunmasına neden olabilir.

BEKLENEN DEĞERLER

Clostridium difficile hastalığı, temel olarak yaşlı hastalarda görülen nosokomiyal bir hastalıktır ve bu hastalığın görülme sıklığı hasta nüfusu, kurum türü ve epidemiyoloji gibi faktörlere bağlıdır. Antibiyotik ilişkili diyaresi olan hastalarda rapor edilmiş olan *C. difficile* hastalığı oranı %5 ile 20 arasındadır ve hastanelerde bu oranlardan daha düşük ya da yüksek oranlar görülebilir. Bazı sağlıklı yetişkinler ile büyük miktarda sağlıklı bebekte (%50'ye kadar) *C. difficile* toksini pozitif sonuç verebileceğinden, test sonuçlarının klinik semptomlar ile birlikte değerlendirilmesi önemlidir. Buna ek olarak, kistik fibroz hastalarında %22 ila %32 arası bir *C. difficile* taşıyıcı oranı olduğu rapor edilmiştir (1,3). Bu cihaz için gerçekleştirilen ve semptom gösteren hastalar üzerinde yürütülen çalışmalarda A ve B toksinlerine rastlanma oranı %12, GDH oranı ise %18'dir. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin antijen bölümünde alınan pozitif sonuç, dışkı örneğinde *C. difficile* bulunduğunu, negatif sonuç ise bu organizmanın bulunmadığını gösterir. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin toksin bölümünde alınan pozitif sonuç, dışkı örneğinde *C. difficile* bulunduğunu, negatif sonuç ise toksin bulunmadığını ya da toksin düzeyinin saptama için yetersiz olduğunu gösterir.

PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

***C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin antijen bölümünün klinik değerlendirmesi**
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® testinin antijen bölümünün bakteri kültürü ile karşılaştırılması. Değerlendirmeye dahil edilen örnekler, rutin test için klinik laboratuvara gönderilmiştir. Kurum içi prosedürlere uygun şekilde bakteri kültürü testi yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin bakteri kültürü ile karşılaştırmasına yönelik klinik performans özeti

n = 1126	Bakteri Kültürü Pozitif	Bakteri Kültürü Negatif
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antijen Çizgisi Pozitif	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antijen Çizgisi Negatif	21	842

		%95 Güvenilirlik Sınırı
Hassasiyet	90,5%	85,7 – 93,9
Özgüllük	93,1%	91,2 – 94,7
Pozitif Belirleyicilik Değeri	76,4%	70,7 – 81,3
Negatif Belirleyicilik Değeri	97,6%	96,2 – 98,4
Korelasyon	92,6%	91,8 – 93,4

Farklı örnekler güncel ELISA testleri kullanılarak *C. difficile* glutamat dehidrojenaz için değerlendirilmiştir.
62 yalancı pozitif örneğin yirmi dokuzu, başka bir GDH testinde de pozitif sonuç vermiş ve gerçek pozitif olarak değerlendirilmiştir.
21 yalancı negatif örneğin on üçü başka bir GDH testinde de negatif sonuç vermiş ve gerçek negatif olarak değerlendirilmiştir.

C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® testinin antijen bölümü, C. difficile toksini saptaması için doku kültürü testi ile karşılaştırılmıştır. Değerlendirmeye dahil edilen örnekler, rutin test için klinik laboratuvara gönderilmiştir. Sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin antijen bölümünde doku kültürü-pozitif örneklerinin %98,7'si algılanmıştır.

Tablo 2. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin doku kültürü testi ile karşılaştırmasına yönelik klinik performans özeti

n = 1126	Doku Kültürü Pozitif	Doku Kültürü Negatif
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antijen Çizgisi Pozitif	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antijen Çizgisi Negatif	2	861

***C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin toksin bölümünün klinik değerlendirmesi**
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® testinin toksin bölümü iki klinik laboratuvarda ve TECHLAB®, Inc'de kurum içinde doku kültürü testi ile karşılaştırılmıştır. Bu değerlendirmeye dahil edilen örnekler, rutin testler için klinik laboratuvarlara gönderilmiştir. Sonuçlar Tablo 3'de gösterilmektedir.

Tablo 3. *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin doku kültürü testi ile karşılaştırmasına yönelik klinik performans özeti

n = 1126	Doku Kültürü Pozitif	Doku Kültürü Negatif
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toksin Çizgisi Pozitif	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toksin Çizgisi Negatif	19	964

		%95 Güvenilirlik Sınırı
Hassasiyet	87,8%	81,4 - 92,3
Özgüllük	99,4%	98,6 - 99,7
Pozitif Belirleyicilik Değeri	95,8%	90,7 - 98,3
Negatif Belirleyicilik Değeri	98,1%	96,9 - 98,8
Korelasyon	97,8%	97,6 - 98,0

Farklı örnekler güncel ELISA testleri kullanılarak A ve B toksinleri için test edilmiştir.
6 adet yalancı pozitif örnekten beşi ELISA ile pozitif sonuç vermiş ve gerçek pozitif olarak değerlendirilmiştir.
19 yalancı negatif örneğin on ikisi ELISA testinde de negatif sonuç vermiş ve gerçek negatif olarak değerlendirilmiştir.

DIŞKI ÖRNEĞİ KIVAMININ ETKİSİ

Dışkı örneği kıvamının *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® üzerindeki etkisi
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® testinin antijen bölümünde (n=978) ve toksin bölümünde (n=981) farklı kıvamlardaki dışkı örneklerinin reaksiyonları Tablo 4 ve 5'te verilmiştir. Kültür testi ya da *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testi kullanılarak elde edilen pozitif reaksiyon yüzdeleri üç tür dışkı örneğinde de (sıvı, yarı katı ve katı) benzerdir. Tüm örnekler C. difficile testi için gönderilmiştir. Gönderi sırasında örnek kıvamı değil, hasta geçmişi temel alınmıştır. Antijen bölümünde, sonuçlar, farklı kıvamlarda örnekler test edilirken *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin bakteri kültüründe de benzer şekilde performans gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Toksin bölümünde, sonuçlar, farklı kıvamlarda örnekler test edilirken *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin doku kültürü testinde de benzer şekilde performans gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Tablo 4. ***C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin antijen bölümünde farklı kıvamda dışkı örneklerinin reaksiyonu**

Örnek sayısı (n = 978)	Sıvı Örnekler (n = 335)	Yarı-katı Örnekler (n = 522)	Katı Örnekler (n = 121)
Bakteri kültürü testinde pozitif	59 (17,6%)	110 (21,1%)	19 (15,7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antijen Çizgisi Pozitif	72 (21,5%)	128 (24,5%)	25 (20,7%)
Bakteri kültürü testinde negatif	276 (82,4%)	412 (78,9%)	102 (84,3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Antijen Çizgisi Negatif	263 (78,5%)	394 (75,5%)	96 (79,3%)

Tablo 5. ***C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin toksin bölümünde farklı kıvamda dışkı örneklerinin reaksiyonu**

Örnek sayısı (n = 981)	Sıvı Örnekler (n = 336)	Yarı-katı Örnekler (n = 523)	Katı Örnekler (n = 122)
Doku kültürü testinde pozitif	43 (12,8%)	81 (15,5%)	8 (6,6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toksin Çizgisi Pozitif	42 (12,5%)	72 (13,8%)	7 (5,7%)
Doku kültürü testinde negatif	293 (87,2%)	442 (84,5%)	114 (93,4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Toksin Çizgisi Negatif	294 (87,5%)	451 (86,2%)	115 (94,3%)

ANALİTİK HASSASİYET
Test geçirimi A toksini için 0,63 ng/mL, B toksini için 0,16 ng/mL ve glutamat dehidrojenaz için 0,8 ng/mL konsantrasyonda olacak şekilde belirlenmiştir.

TEKRARLANABİLİRLİK
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® testinin tekrarlanabilirliği, test sırasında tanımlanmamak üzere kodlanmış 12 adet dışkı örneği kullanımını içermektedir. Test, örnekleri 3 gün boyunca test eden 3 adet bağımsız laboratuvarda gerçekleştirilmiştir. Örnekler, %100 oranda beklenen sonuçları vermiştir.

ÇAPRAZ REAKSİYON
Nihai konsantrasyon olarak yaklaşık 10^8 ya da daha yüksek değerde bulunmak şartıyla, aşağıdaki organizasyonlarla aşılanmış olan dışkı örnekleri, *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinin antijen ya da toksin bölümünde reaksiyona girmemiştir:

Bakteri veya Patojen: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (toksijen olmayan), *Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans), *Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® testi toksin bölümünde reaksiyon gösteren tek *C. difficile* dışı organizma *Clostridium sordellii* VPI 9048'dir. Bu tür, sırasıyla A ve B toksinleri ile homolog olan HT ve LT toksinlerini üretir.
0,2 mL'de $10^{3.3}$ ila $10^{8.25}$ TCID biriminde görülme şartıyla, aşağıdaki virüsler *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testinde reaksiyona girmemiştir:
Virüsler: Adenovirüs türleri 1, 2, 3, 5, 40, 41, İnsan koronavirüsü, Koksakivirüs B2, B3, B4, B5, Ekovirüs 9, 11, 18, 22, 33, Enterovirüs türleri 68, 69, 70, 71, Rotavirüs.

ETKİLEŞEN MADDELER
Dışkıda aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda bulunduğunda, test sonuçları üzerinde etkisi olmayan maddeler (A.B.D. formülasyonu) aşağıda verilmiştir: musin (%3,5 w/v), insan kanı (%40 v/v), baryum sülfat (%5 w/v), Imodium® (%5 v/v), Kaopectate® (%5 v/v), Pepto-Bismol® (%5 v/v), sterik/palmitik asit (%40 w/v), Metronidazol (%0,25 w/v), Vankomisin (%0,25 w/v).

SİKLOSERİN-SEFOKSİTİN-FRUKTOZ AGAR (CCFA) İLE ELDE EDİLEN KLİNİK İZOLATLARIN REAKSİYONU
37°C sıcaklıkta CCFA üzerinde anaerobik bakteri kültürü testi yapılmasından 3 gün sonra elde edilen toplam 103 *C. difficile* klinik izolatı *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® testi ile test edilmiştir. Analiz için, dışkı örnekleri için önerilen şekilde bağımsız koloniler seçilmiş ve *Seyrelticide* bekletilmiştir. 103 izolatın tümü teste pozitif antijeni reaksiyonu vermiştir.
103 izolatın yetmişi (%68) doku kültürü testinde *C. difficile* toksini için pozitif sonuç veren dışkı örneklerine aittir. Bunların 56 tanesi (%80) 3 gün boyunca 37°C'de CCFA üzerinde gerçekleşen anaerobik büyüme sonrasında değerlendirildiğinde pozitif toksin reaksiyonu vermiştir.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

НАЗНАЧЕНИЕ

Анализ TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* – это мембранный иммуноферментный экспресс-анализ, предназначенный для одновременного обнаружения антигенов глутаматдегидрогеназы и токсинов A и B *Clostridium difficile* в одной реакционной лунке. Анализ позволяет обнаружить антиген *C. difficile* – глутаматдегидрогеназу, что дает возможность подтвердить присутствие бактерий *C. difficile*. Кроме того, анализ позволяет подтвердить наличие токсикогенных бактерий *C. difficile*, выявляя токсины A и B в пробах фекалий, взятых у людей, которые, возможно, имеют заболевания, вызванные *C. difficile*. Анализ должен использоваться как вспомогательное средство при диагностике заболеваний, вызванных *C. difficile*. Как и для других анализов *C. difficile*, результаты анализа должны интерпретироваться с учетом истории болезни пациента.

ОПИСАНИЕ

После лечебного курса с использованием антибиотиков у многих пациентов возникают проблемы с желудочно-кишечным трактом: это может быть как непродолжительная диарея, так и тяжелые формы псевдомембранозного колита. Многие случаи легких форм заболеваний желудочно-кишечного тракта и большинство случаев псевдомембранозного колита вызываются токсикогенными штаммами *Clostridium difficile* (1). Этот организм является оппортунистической анаэробной бактерией, которая размножается в кишечнике, если нормальная флора изменяется под влиянием антибиотика. Токсикогенные штаммы *C. difficile* имеют гены, которые обусловливают выработку токсинов, в то время как нетоксикогенные штаммы не имеют таких генов. Начало заболевания связано с токсинами, которые вырабатываются токсикогенным организмом. Считается, что клинические симптомы данного заболевания прежде всего вызываются токсином A – энтеротоксином, который повреждает ткани (2,3). Бактерии *C. difficile* также вырабатывают второй вид токсина – токсин B. Токсин B, который называют цитотоксином организма, – это токсин, который обнаруживается с помощью анализа тканевой культуры, используемого во многих лабораториях. Токсикогенные штаммы *C. difficile* могут вырабатывать оба токсина или только токсин B (4–7). Глутаматдегидрогеназа *C. difficile* – это качественный антиген-маркер для организма в фекалиях, так как он вырабатывается в больших количествах всеми штаммами: как токсикогенными, так нетоксикогенными (8–10). Антиген можно обнаружить в пробах фекалий с помощью анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Положительный результат анализа на наличие глутаматдегидрогеназы *C. difficile* подтверждает присутствие этого организма в пробе фекалий; отрицательный результат указывает на отсутствие этого организма. Положительный результат теста на наличие токсинов A и B подтверждает присутствие токсикогенных штаммов *C. difficile*.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ АНАЛИЗА

В анализе *C. DIFF QUIK CHECK COMPLETE®* используются антитела, специфичные для глутаматдегидрогеназы и токсинов A и B штаммов *C. difficile*. Устройство включает окно реакции с тремя линиями неподвижных антител. Тестовая линия антигена («Ag») содержит антитела к глутаматдегидрогеназе *C. difficile*. Контрольная линия («C») – это пунктирная линия, которая содержит антитела пероксидазы хрена (HRP). Тестовая линия токсинов A и B («Tox») содержит антитела к токсинам A и B *C. difficile*. *Конъюгат* содержит антитела к глутаматдегидрогеназе и антитела к токсинам A и B, которые соединены с молекулами пероксидазы хрена. Для проведения анализа проба добавляется в пробирку, содержащую смесь *растворителя* и *конъюгата*. Растворенная смесь пробы и конъюгата добавляется в *лунку для пробы*, после чего устройство необходимо оставить на 15 минут, чтобы произошла инкубация при комнатной температуре. В ходе инкубации молекулы глутаматдегидрогеназы и токсинов A и B в пробе связываются с конъюгатами антител и пероксидазы. Комплексы антиген-антитело-конъюгат проникают через фильтровальную ткань и попадают на мембрану, где они захватываются неподвижными антителами в линиях, специфичными к глутаматдегидрогеназе и токсинам A и B. Затем *окно реакции* промывается с использованием *буферного раствора для промывания*, после чего добавляется *субстрат*. После 10-минутного инкубационного периода реакция «Ag» проверяется визуально: на стороне «Ag» *окна реакции* должна появиться вертикальная голубая линия. Появление голубой линии указывает на положительный результат анализа. Если результат анализа «Ag» положительный, необходимо визуально проверить реакцию «Tox»: на стороне «Tox» *окна реакции* должна появиться голубая линия. Появление голубой линии указывает на положительный результат анализа. Положительная реакция «C», на которую указывает вертикальная голубая линия в области «C» *окна реакции* подтверждает, что анализ выполнен правильно и результаты являются достоверными.

ПРЕДОСТАВЛЕННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

MEM | DEV — ***Мембранные устройства*** – каждая упаковка содержит 1 устройство

DIL | SPE — ***Растворитель* (флакон, 22 мл)** – буферный белковый раствор с градуированной пипеткой (содержит 0,05 % ProClin® 300)*

WASH | REAG — ***Буферный раствор для промывания* (флакон, 12 мл)** – буферный раствор с градуированной пипеткой (содержит 0,05 % ProClin® 300)*

SUBS | REAG — ***Субстрат* (флакон, 3,5 мл)** – раствор тетраметилбензидина

CONJ | ENZ — ***Конъюгат* (флакон, 2,5 мл)** – мышиные моноклональные антитела к глутаматдегидрогеназе, соединенные с молекулами пероксидазы хрена, и козьи поликлональные антитела к токсинам A и B, соединенные с молекулами пероксидазы хрена, в буферном белковом растворе (содержит 0,05 % ProClin® 300)*

CONTROL | + — ***Положительный контрольный образец* (2 мл)** – антиген в буферном белковом растворе

Одноразовые пластиковые пипетки – с градуированной шкалой 25 мкл, 400 мкл и 500 мкл

IVD — Для диагностики *in vitro*

*Сигнальное слово: Предупреждение
H317: Может вызывать аллергическую кожную реакцию
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Тестовые пробирки небольшого размера (например, пластиковые пробирки типа Эппендорф или стеклянные пробирки)

Палочки-тампоны	*Таймер*	*Вихревый смеситель*
Одноразовые перчатки для работы с пробами фекалий		*Пипеттор и насадки*

СРОКИ И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Срок годности набора указан на наклейке. Сроки годности каждого компонента указаны на отдельных наклейках. Набор должен храниться при температуре 2–8 °C.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Не следует смешивать реагенты из различных наборов или брать реагенты из различных наборов. Не используйте набор, если его срок годности истек.
2. Осмотрите каждый компонент набора на наличие утечек. После получения осмотрите набор, чтобы убедиться, что компоненты не замерзли и не являются теплыми на ощупь из-за неправильных условий транспортировки.
3. Все компоненты должны иметь КОМНАТНУЮ ТЕМПЕРАТУРУ ПЕРЕД ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ!
4. Крышки, насадки и пипетки помечаются различными цветами; НЕ путайте их и НЕ меняйте их!
5. Не замораживайте реагенты. Набор должен храниться при температуре 2–8 °C.
6. Упаковка с *мембранным устройством* должна иметь комнатную температуру, прежде чем ее можно будет открыть. Мембранные устройства должны быть сухими перед использованием.

RU

7. Пробы фекалий должны использоваться в течение 72 часов после забора пробы, чтобы обеспечить оптимальные результаты. Замерзшие пробы могут утратить активность из-за замерзания и последующего размораживания. В случае использования замороженных образцов дождитесь, пока они нагреются до комнатной температуры.
8. Держите флакон с реагентом вертикально, чтобы обеспечить одинаковый размер капель и набрать необходимый объем реагента.
9. Пробы и мембранные устройства должны обрабатываться и утилизироваться после использования как источники потенциальной биологической опасности.
10. Запрещается повторно использовать мембранные устройства.
11. Данный анализ был оптимизирован с точки зрения чувствительности и специфичности. Отклонения от указанной процедуры и/или условий проведения анализа могут повлиять на чувствительность и специфичность анализа. Не отклоняйтесь от указанной процедуры.
12. Если анализируется несколько проб фекалий, контролируйте общее время анализа. Сначала добавьте *растворитель*, затем добавьте *конъюгат* в каждую пробирку с *растворителем*. Затем добавьте пробу в пробирку с *растворителем* и *конъюгатом*. Тщательно перемешайте все растворенные пробы и поместите их в *мембранное устройство*. 15-минутный инкубационный период начинается после того, как последняя смесь с раствором пробы и конъюгата помещена в *мембранное устройство*.
13. Если цвет реагента *субстрата* меняется на синий или фиолетовый, свяжитесь со службой технической поддержки, чтобы произвести замену.
14. Пробы фекалий могут содержать потенциально инфекционные агенты, и манипуляции с ними должны производиться в соответствии с требованиями «Уровня биологической опасности 2», как рекомендовано в Руководстве CDC/NIH «Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях».
15. Все реагенты предназначены исключительно для диагностики *in vitro*.
16. При выполнении анализа необходимо надевать одноразовые перчатки.
17. Реагенты содержат 0,05 % ProClin® 300 в качестве консерванта. Хотя его концентрация мала, ProClin® 300 является известным вредным веществом. В случае появления на коже раздражения или сыпи обратитесь к медицинскому специалисту. Снимите загрязненную одежду и постирайте ее, прежде чем одевать снова. Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с действующими требованиями техники безопасности в лаборатории и надлежащими лабораторными практиками. Паспорта безопасности для данного продукта предоставляются по запросу, обратитесь в службу технической поддержки.
18. Следуйте правилам утилизации отходов, которые действуют в вашей стране, регионе и местности.

ЗАБОР ПРОБ ФЕКАЛИЙ, ОБРАЩЕНИЕ С НИМИ И ХРАНЕНИЕ

Приемлемые типы проб
Свежие пробы фекалий
Замороженные пробы фекалий
Пробы в транспортной среде (Cary Blair, C&S)

Запрещено использовать
Пробы фекалий, выдержанные в формалиновом фиксаторе (например, формалин с ацетатом натрия, раствор формалина 10 %, формалин с мертиолятом)
Пробы фекалий, выдержанные в спиртовом фиксаторе (например, поливиниловый спирт)

Хранение проб Температура	Допустимый срок хранения	Комментарии
2–8 °C	72 часа	Идеальные пробы должны быть взяты не более чем за 24 часа до анализа
Замороженные ≤ –10 °C	Более чем 72 часа	Дождитесь, пока проба нагреется до комнатной температуры. Многократное замораживание и размораживание может привести к утрате активности пробы из-за разрушения токсинов.

1. Допускается использовать стандартные процедуры забора пробы и методы обращения, которые используются в лаборатории для работы с пробами фекалий.
2. Пробы фекалий должны храниться в чистых и герметичных контейнерах.
3. НЕ РЕКОМЕНДУЕТСЯ хранить пробы фекалий в *растворителе*.
4. Не допускайте, чтобы пробы фекалий находились в смеси *растворителя и конъюгата* в течение более чем 24 часов.

ПОДГОТОВКА ПРОБЫ

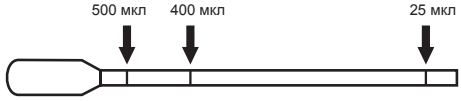
1. Дождитесь, пока все реагенты и необходимое количество устройств нагреются до комнатной температуры, прежде чем их использовать. Рекомендуется извлечь реагенты из пенопластового вкладыша, чтобы они могли быстрее нагреться до комнатной температуры.
2. Подготовьте и промаркируйте по одной небольшой тестовой пробирке для каждой пробы и для дополнительных внешних контрольных образцов, если необходимо.
3. Используя черную градуированную пипетку, добавьте 750 мкл (2-е деление от кончика) *растворителя* в каждую пробирку для проб фекалий. **Для проб в транспортных средах, таких как Cary Blair или C&S, добавьте 650 мкл (1-я градуированная полоска от кончика) *растворителя* в пробирку.**

Тип пробы	Объем *растворителя*
Свежие пробы фекалий	750 мкл (2-е деление от кончика)
Замороженные пробы фекалий (замороженные, без растворителя)	750 мкл (2-е деление от кончика)
Пробы в транспортной среде (Cary Blair, C&S)	650 мкл (1-я градуированная полоска от кончика)
Внешние контрольные пробы (положительная и отрицательная)	750 мкл (2-е деление от кончика)



4. Добавьте по одной капле *конъюгата* (флакон с красной крышкой) в каждую пробирку.
5. Используйте одну одноразовую пластиковую пипетку (входит в комплект поставки) для каждой пробы. Каждая пипетка имеет градуировку с делениями 25 мкл, 400 мкл и 500 мкл.

Градуированная пипетка:



6. **Тщательно перемешайте все пробы независимо от консистенции. Важно, чтобы проба образовала однородную суспензию, прежде чем переносить ее.**
Жидкие/полужидкие пробы – наберите 25 мкл пробы в пипетку и поместите пробу в смесь *растворителя и конъюгата*. Используя ту же пипетку, перемешайте растворенную пробу.

Затвердевшие/плотные пробы – необходимо добавить правильное количество затвердевших фекалий в смесь с пробой. Тщательно перемешайте пробу, используя деревянную палочку-тампон, и переместите небольшую часть (диаметром приблизительно 2 мм, эквивалент 25 мкл) пробы в смесь растворителя и конъюгата. Измельчите пробу с помощью палочки-тампона.

Пробы фекалий в транспортной среде Cary Blair или C&S – добавьте 100 мкл (2 капли из пипетки) пробы в смесь *растворителя и конъюгата*.

7. **Дополнительные пробы для внешнего контроля:**

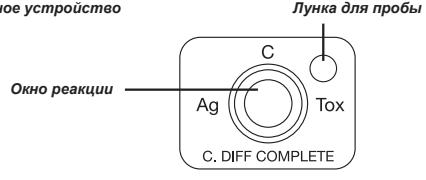
Положительный контрольный образец для внешнего контроля – добавьте одну каплю *положительного контрольного образца* (флакон с серой крышкой) в смесь *растворителя и конъюгата*.

Отрицательный контрольный образец для внешнего контроля – добавьте 25 мкл *растворителя* в смесь *растворителя и конъюгата*.

ПРИМЕЧАНИЕ. Если добавлено слишком маленькое количество пробы или не удалось размешать и добиться однородной суспензии пробы в смеси растворителя и конъюгата, это может привести к неверному отрицательному результату анализа. Если добавлено слишком большое количество пробы фекалий, могут быть получены неправильные результаты из-за ограниченного тока пробы.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Подготовьте одно *мембранное устройство* на пробу и одно устройство на каждый дополнительный положительный или отрицательный образец для внешнего контроля, если необходимо. Упаковка из фольги, в которой находятся устройства, должна нагреться до комнатной температуры, прежде чем можно будет ее использовать. Используйте устройство сразу же после раскрытия упаковки. Промаркируйте каждое устройство соответствующим образом и расположите его на плоской поверхности таким образом, чтобы надпись «C. DIFF COMPLETE» находилась внизу устройства, а небольшая лунка для пробы – в верхнем правом углу устройства.



2. Закройте каждую пробирку с растворенной пробой и тщательно перемешайте содержимое. Для этого достаточно несколько раз перевернуть пробирку или сделать ею несколько круговых движений. После того как проба пациента или *положительный контрольный образец* растворились в смеси *растворителя и конъюгата*, необходимо оставить ее на некоторое время (до 24 часов) для инкубации при комнатной температуре, прежде чем добавлять в *мембранное устройство*.
3. Используя новую пипетку, перенесите 500 мкл растворенной смеси пробы и конъюгата в ***лунку для пробы*** (углубление меньшего размера в верхнем правом углу устройства) *мембранного устройства*: жидкая проба должна попасть на капиллярную прокладку в *мембранном устройстве*. При добавлении пробы в лунку убедитесь, что кончик пипетки наклонен в направлении *окна реакции* (более крупное углубление в центре устройства).
4. Обеспечьте инкубацию в устройстве при комнатной температуре по крайней мере в течение 15 минут: проба за счет капиллярного эффекта проникнет через устройство, и влажный участок достигнет *окна реакции*.

УБЕДИТЕСЬ, ЧТО ВПИТЫВАНИЕ ПРОБЫ ПРОИЗОШЛО:

Иногда растворенная проба не впитывается надлежащим образом, и окно реакции не увлажняется полностью. Если окно реакции не увлажняется полностью в течение 5 минут после добавления пробы в лунку, добавьте 100 мкл (4 капли) растворителя в лунку для пробы и подождите еще 5 минут (всего 20 минут).

5. После инкубации добавьте 300 мкл *буферного раствора для промывания* в ***окно реакции***, используя градуированную пипетку с белым колпачком. *Буферный раствор для промывания* должен пройти через мембрану окна реакции и полностью впитаться.
6. Добавьте 2 капли *субстрата* (флакон с белым колпачком) в ***окно реакции***. Осмотрите окно и запишите результаты визуального осмотра через 10 минут.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Интерпретация анализа наиболее достоверна, когда показания устройства прочитываются сразу же после завершения 10-минутного периода реакции. Осмотрите устройство на стандартном рабочем расстоянии в хорошо освещенном помещении. Необходимо смотреть на устройство сверху.
2. Убедитесь, что на устройстве по центру *окна реакции* отображаются голубые точки, которые указывают на результат внутреннего положительного контрольного образца. Появление контрольных точек показывает, что внутренний контроль был выполнен надлежащим образом. Фон может иметь белый цвет или слегка голубоватый. Осмотрите устройство на наличие голубых линий на участках «Ag» и «Tox» в *окне реакции*, где находятся тестовые линии. Линии могут иметь различную интенсивность окраски: от легкого оттенка до темного цвета.
3. **Положительный результат антигена («Ag»):** Положительный результат антигена может быть определен в любой момент времени между добавлением *субстрата* и временем считывания результатов (10 минут). При положительном результате антигена отображается голубая линия «Ag» и голубая пунктирная контрольная линия под надписью «C» (Рис. 1а). Линии могут иметь различную интенсивность окраски: от легкого оттенка до темного цвета. Явная частичная линия интерпретируется как положительный результат. Не следует интерпретировать изменение цвета мембраны как положительный результат. Положительный результат указывает на присутствие штаммов *C. difficile*.
4. **Положительный результат антигена и токсина («Tox»):** Если результат антигена положительный (т. е. отображается голубая линия «Ag» и голубая пунктирная контрольная линия «C»), необходимо проверить результат контроля на наличие токсина. Положительный результат токсина может быть определен в любой момент времени между добавлением *субстрата* и временем считывания результатов (10 минут). При положительном результате токсина отображается голубая линия «Tox» (Рис. 1б). Линия может иметь различную интенсивность окраски: от легкого оттенка до темного цвета. Явная частичная линия интерпретируется как положительный результат. Не следует интерпретировать изменение цвета мембраны как положительный результат. Положительный результат указывает на присутствие токсина *C. difficile*.
5. **Отрицательный результат:** Тест не может интерпретироваться как отрицательный или недействительный, пока не прошло 10 минут после добавления *субстрата*. Единственная голубая пунктирная линия отображается в середине *окна реакции* под надписью «C», при этом тестовые линии на участках «Ag» или «Tox» в *окне реакции* отсутствуют (Рис. 1в). Отрицательный результат в области антигена показывает, что антиген *C. difficile* отсутствует в пробе или его содержание не превышает предел детектирования анализа. Отрицательный результат в области токсина показывает, что токсин C. difficile отсутствует в пробе или его содержание не превышает предел детектирования анализа.
6. **Недействительный результат:** Линии не отображаются в окне реакции (Рис. 1г). Результат анализа является недопустимым, если после завершения периода реакции под надписью «C» не отображается голубая пунктирная линия (Рис. 1д, 1е, 1ж).
7. **Отрицательный результат антигена («Ag»), положительный результат токсина («Tox»):** Незначительная доля проб при анализе может давать отрицательный результат для антигена и положительный для токсина. Такие пробы должны считаться неопределенными, и необходимо повторно провести анализ, используя свежую пробу (Рис. 1з). Если при повторном анализе будет получен отрицательный результат для антигена и положительный для токсина, необходимо зарегистрировать результат как положительный результат для токсина.

РИС. 1: ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

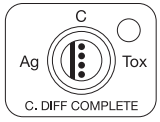


Рис. 1а
Положительный результат антигена

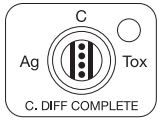


Рис. 1б
Положительный результат антигена и токсина

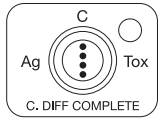


Рис. 1в
Отрицательный результат

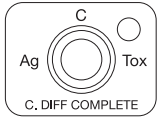


Рис. 1г
Недействительный результат

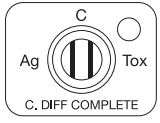


Рис. 1д
Недействительный результат

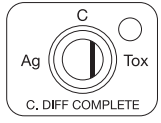


Рис. 1е
Недействительный результат

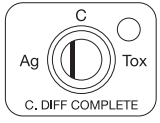


Рис. 1ж
Недействительный результат

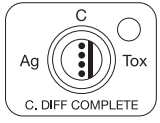


Рис. 1з
См. пункт №7 для интерпретации

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Внутренний: Голубая пунктирная линия должна отображаться по центру *окна реакции* под надписью «C» на каждом тестируемом *мембранном устройстве*. Появление голубой контрольной пунктирной линии подтверждает, что проба и реагенты были добавлены правильно, что реагенты были активными на момент выполнения анализа и что проба надлежащим образом попала на *мембранное устройство*. Это также подтверждает реактивность других реагентов, связанных с анализом. Чистый фон в области результата должен рассматриваться как отрицательный результат внутреннего контроля. Если анализ был выполнен правильно и реагенты прореагировали надлежащим образом, фон должен быть белым, чтобы обеспечить четкое отображение результатов.

Внешний: Реактивность набора *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* должна проверяться после получения с использованием *положительного контрольного образца* и отрицательного контрольного образца (*растворитель*). *Положительный контрольный образец* входит в комплект поставки набора (флакон с серой крышкой). *Положительный контрольный образец* подтверждает реактивность других реагентов, связанных с анализом, но не обеспечивает точность результатов анализа. *Растворитель* используется как отрицательный контрольный образец. Можно выполнить дополнительные тесты, используя контрольные образцы, которые соответствуют требованиям местных, областных и/или федеральных норм и требованиям аккредитующих организаций.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Анализ *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* используется для распознавания антигена и токсинов C. difficile в пробах фекалий. Анализ позволяет подтвердить наличие токсина в фекалиях, и эта информация должна учитываться лечащим врачом наряду с историей болезни и результатами физического осмотра пациента. Анализ *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* позволяет распознать токсин A при концентрации ≥ 0,63 нг/мл, токсин B – при концентрации ≥ 0,16 нг/мл и глутаматдегидрогеназу – при концентрации ≥ 0,8 нг/мл.
2. Пробы фекалий имеют очень сложную структуру. Оптимальные результаты анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* можно получить для проб, которые были взяты не более чем за 24 часа до анализа. Большинство нерастворенных проб можно хранить при температуре 2–8 °C в течение 72 часов, после чего начинается значительное разрушение токсина. Если пробы не были проанализированы в течение этого периода, их можно заморозить и затем разморозить перед анализом. Однако повторное замораживание и размораживание может привести к утрате иммунореактивности антигена и токсинов A и B.
3. Для некоторых проб наблюдаются слабые реакции. Это может быть вызвано различными факторами, такими как низкая концентрация антигена и/или токсина, присутствие связующих веществ или наличие инактивирующих ферментов в фекалиях. Линии могут иметь различную интенсивность окраски: от легкого оттенка до темного цвета. Эти пробы должны регистрироваться как положительные, если отображается любая, даже частичная, линия голубого цвета. Явная частичная линия голубого цвета интерпретируется как положительный результат.
4. Не разрешается использовать пробы фекалий, которые хранились в 10-процентном растворе формалина, в формалине с мертиолятом, в формалине с ацетатом натрия или в поливиниловом спирте.
5. Анализ *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* является качественным. Интенсивность окраски не должна интерпретироваться количественно.
6. Некоторые штаммы *C. sordellii* могут реагировать во время анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* в связи с тем, что они вырабатывают иммунологически связанные токсины (1).
7. Для младенцев может регистрироваться уровень колонизации микрофлоры кишечника до 50 %. Высокий уровень также может регистрироваться для пациентов с муковисцидозом (1,3). В этих группах результаты могут быть положительными, однако они должны рассматриваться с учетом возможности быть носителем колоний этих бактерий.
8. Единственный организм, который не относится к *C. difficile* и дает реакцию в области анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*, – это штамм *Clostridium sordellii* VPI 9048. Этот штамм вырабатывает токсины HT и LT, которые являются гомологичными для токсинов A и B соответственно.
9. Отсутствуют данные, которые говорят о влиянии промывания толстой кишки, бариевой клизмы, слабительных или подготовки кишечника на результаты анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Все эти процедуры могут привести к значительному разжижению фекалий или могут вызвать присутствие добавок, которые могут повлиять на результаты анализа.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Заболевания *Clostridium difficile* – это в основном нозокомиальные заболевания пациентов престарелого возраста, и частота этих заболеваний зависит от различных факторов, например от количества пациентов, типа учреждения и эпидемиологической обстановки. Зарегистрированная частота заболеваний *C. difficile* у пациентов с диареей после приема антибиотиков может составлять от 5 % до 20 %, и в больницах может фиксироваться уровень заболеваемости ниже или выше этого диапазона. Важно рассматривать результаты анализа с учетом клинических симптомов, так как пробы фекалий некоторых здоровых взрослых и большого количества здоровых младенцев (до 50 %) дают положительный результат при анализе на наличие токсина *C. difficile*. Кроме того, уровень носительства *C. difficile* в диапазоне от 22 % до 32 % был отмечен для пациентов с муковисцидозом (1,3). В исследованиях, которые проводились для этого устройства с участием пациентов с симптомами, уровень присутствия токсинов A и B составил 12 %, а значение глутаматдегидрогеназы (GDH) – 18 %. Положительный результат в области антигена при анализе *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* подтверждает присутствие штаммов *C. difficile* в пробе фекалий; отрицательный результат указывает на отсутствие этих организмов. Положительный результат в области токсина при

анализе *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® подтверждает присутствие токсина *C. difficile* в пробе фекалий; отрицательный результат указывает на отсутствие токсина или недостаточно высокую концентрацию токсина для обнаружения.

ХАРАКТЕРИСТИКИ РАБОТЫ

Клиническая оценка обнаружения антигена с помощью анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®
Участок антигена анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® сравнивался с бактериальной культурой. Пробы, которые участвовали в оценке, были отправлены в клинические лаборатории для проведения стандартных анализов. Анализ бактериальной культуры был выполнен в соответствии с внутренними процедурами. Результаты показаны в Таблице 1.

Таблица 1. Обзор клинической производительности: сравнение анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® с бактериальной культурой

n = 1126	Бактериальная культура Положительный	Бактериальная культура Отрицательный
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Линия антигена – положительный	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Линия антигена – отрицательный	21	842

		Предел достоверности 95 %
Чувствительность	90,5%	85,7 – 93,9
Специфичность	93,1%	91,2 – 94,7
Прогнозируемое положительное значение	76,4%	70,7 – 81,3
Прогнозируемое отрицательное значение	97,6%	96,2 – 98,4
Корреляция	92,6%	91,8 – 93,4

Противоречивые пробы оценивались с использованием текущих анализов ELISA на наличие глутаматдегидрогеназы *C. difficile*.
29 из 62 ложно положительных проб показали положительный результат при использовании другого анализа GDH, поэтому они рассматривались как истинно положительные.
13 и 21 ложно отрицательной пробы показали отрицательный результат при использовании другого анализа на наличие глутаматдегидрогеназы (GDH), поэтому они рассматривались как истинно отрицательные.

Участок антигена анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® сравнивался с анализом тканевой культуры с целью обнаружения токсина C. difficile. Пробы, которые участвовали в оценке, были отправлены в клинические лаборатории для проведения стандартных анализов. Результаты показаны в Таблице 2. Участок антигена анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® обнаружил антиген в 98,7 % образцах тканевых культур с положительным результатом.

Таблица 2. Обзор клинической производительности: сравнение анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® с анализом тканевой культуры

n = 1126	Тканевая культура Положительный	Тканевая культура Отрицательный
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Линия антигена – положительный	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Линия антигена – отрицательный	2	861

Клиническая оценка обнаружения токсина с помощью анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®
Участок токсина анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® сравнивался с анализом тканевой культуры в двух клинических лабораториях и в собственной лаборатории TECHLAB®, Inc. Пробы, которые участвовали в оценке, были отправлены в клинические лаборатории для проведения стандартных анализов. Результаты показаны в Таблице 3.

Таблица 3. Обзор клинической производительности: сравнение анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® с анализом тканевой культуры

n = 1126	Тканевая культура Положительный	Тканевая культура Отрицательный
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Линия токсина – положительный	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Линия токсина – отрицательный	19	964

		Предел достоверности 95 %
Чувствительность	87,8%	81,4 - 92,3
Специфичность	99,4%	98,6 - 99,7
Прогнозируемое положительное значение	95,8%	90,7 - 98,3
Прогнозируемое отрицательное значение	98,1%	96,9 - 98,8
Корреляция	97,8%	97,6 - 98,0

Противоречивые пробы оценивались с использованием текущих анализов ELISA на наличие токсинов A и B.
5 из 6 ложно положительных проб дали положительный результат при анализе ELISA, поэтому они рассматривались как истинно положительные.
12 и 19 ложно отрицательных проб показали отрицательный результат при анализе ELISA, поэтому они рассматривались как истинно отрицательные.

ВЛИЯНИЕ КОНСИСТЕНЦИИ ПРОБЫ ФЕКАЛИЙ

Влияние консистенции пробы фекалий на результаты анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Реакция проб фекалий различной консистенции на участке антигена (n=978) и на участке токсина (n=981) анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® описана в Таблицах 4 и 5. Процентные доли положительных реакций с использованием анализа культуры или анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® были сходными для всех трех типов проб фекалий (жидкая, вязкая, твердая). Все пробы прошли анализ на наличие штаммов C. difficile. Основанием для анализа была история болезни пациента, а не консистенция пробы. На участке антигена результаты показывают, что в ходе анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® были получены примерно одинаковые результаты обнаружения бактериальных культур при анализе проб с различной консистенцией. На участке токсина результаты показывают, что в ходе анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® были получены примерно одинаковые результаты обнаружения тканевых культур при анализе проб с различной консистенцией.

Таблица 4. Реакция проб фекалий с различной консистенцией на участке антигена анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Количество проб (n = 978)	Жидкие пробы (n = 335)	Вязкие пробы (n = 522)	Плотные пробы (n = 121)
Положительный при анализе бактериальной культуры	59 (17,6%)	110 (21,1%)	19 (15,7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Линия антигена – положительный	72 (21,5%)	128 (24,5%)	25 (20,7%)
Отрицательный при анализе бактериальной культуры	276 (82,4%)	412 (78,9%)	102 (84,3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Линия антигена – отрицательный	263 (78,5%)	394 (75,5%)	96 (79,3%)

Таблица 5. Реакция проб фекалий с различной консистенцией на участке токсина анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Количество проб (n = 981)	Жидкие пробы (n = 336)	Вязкие пробы (n = 523)	Плотные пробы (n = 122)
Положительный при анализе тканевой культуры	43 (12,8%)	81 (15,5%)	8 (6,6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Линия токсина – положительный	42 (12,5%)	72 (13,8%)	7 (5,7%)
Отрицательный при анализе тканевой культуры	293 (87,2%)	442 (84,5%)	114 (93,4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Линия токсина – отрицательный	294 (87,5%)	451 (86,2%)	115 (94,3%)

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Предел детектирования анализа: концентрация 0,63 нг/мл для токсина A, 0,16 нг/мл для токсина B и 0,8 нг/мл для глутаматдегидрогеназы.

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Воспроизводимость анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® была определена с использованием 12 проб фекалий, которым были присвоены коды, чтобы избежать идентификации во время анализа. Тестирование проводилось в 3 независимых лабораториях, каждая из которых проверяла пробы в течение 3 дней. При анализе проб был получен прогнозируемый результат 100 % во всех случаях.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

Пробы фекалий с присутствием следующих микроорганизмов с конечной концентрацией приблизительно 10^8 или более организмов на мл не вызывали реакцию на участках антигена или токсина анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®:

Бактерия или патогенный организм: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (нетоксикогенные штаммы), *Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowan), *Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

Единственный организм, который не относится к *C. difficile* и дает реакцию в области анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®, – это штамм *Clostridium sordellii* VPI 9048. Этот штамм вырабатывает токсины HT и LT, которые являются гомологичными для токсинов A и B соответственно.

Следующие вирусы в количестве от $10^{3.3}$ до $10^{8.25}$ TCID единиц на 0,2 мл не вызывали реакцию в анализе *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®:

Вирусы: Аденовирусы типов 1, 2, 3, 5, 40, 41, коронавирусы человека, вирусы Коксаки B2, B3, B4, B5, ECHO-вирусы 9, 11, 18, 22, 33, энтеровирусы типов 68, 69, 70, 71, ротавирусы.

ПРИМЕСИ

Следующие вещества (формулировка США) не влияют на результаты теста в случае присутствия в фекалиях в указанных концентрациях: муцин (3,5 %, вес/объем), человеческая кровь (40 % от объема), сульфат бария (5 %, вес/объем), Imodium® (5 % от объема), Kaopectate® (5 % от объема), Pepto-Bismol® (5 % от объема), стерическая/пальмитиновая кислота (40 %, вес/объем), метронидазол (0,25 %, вес/объем), ванкомицин (0,25 %, вес/объем).

РЕАКЦИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ, ПОЛУЧЕННЫХ В АГАРЕ ЦИКЛОСЕРИН-ЦЕФОКСИТИН-ФРУКТОЗА (CCFA)

Всего было проверено 103 клинических штамма *C. difficile*, полученных из анаэробной бактериальной культуры на агаре CCFA после 3 дней при температуре 37 °C, с использованием анализа *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®. В рамках анализа отдельные колонии отбирались и перемешивались в *растворителе*, как рекомендуется для проб фекалий. Все 103 штамма дали положительную реакцию на антиген в ходе анализа.

70 из 103 штаммов (68 %) были получены из проб фекалий, которые дали положительный результат на наличие токсина *C. difficile* при анализе тканевой культуры. 56 из них (80 %) дали положительную реакцию на токсин при проверке после анаэробного роста на агаре CCFA в течение 3 дней при температуре 37 °C.

TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O teste TECHLAB® *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* é um ensaio imunoenzimático rápido de membrana para a deteção simultânea do antígeno glutamato desidrogenase e das toxinas A e B do *Clostridium difficile* num único poço de reação. O teste deteta o antígeno da *C. difficile*, glutamato desidrogenase, como filtro para a presença de *C. difficile* e confirma a presença de *C. difficile* toxigénico detetando as toxinas A e B em amostras fecais de indivíduos com suspeita de contrair a doença *C. difficile*. O teste deve ser utilizado como um auxílio no diagnóstico da doença *C. difficile*. Tal como com outros testes de *C. difficile*, os resultados devem ser considerados conjuntamente com o histórico do doente.

EXPLICAÇÃO

Após o tratamento com antibióticos, muitos doentes desenvolvem problemas gastrointestinais, que vão desde diarreia leve a colite pseudomembranosa grave. Muitos casos das formas mais leves da doença gastrointestinal e a maioria dos casos de colite pseudomembranosa são causados por estirpes toxigénicas do *Clostridium difficile* (1). Este organismo é uma bactéria anaeróbica oportunista que cresce no intestino logo que existam alterações da flora normal devido aos antibióticos. As estirpes toxigénicas do *C. difficile* carregam os genes que codificam as toxinas enquanto as estirpes não toxigénicas não carregam os genes da toxina. O início da doença está associado às toxinas que são produzidas pelo organismo toxigénico. Acredita-se que os sintomas clínicos associados à doença acontecem devido, principalmente, à toxina A, que é uma enterotoxina prejudicial para os tecidos (2, 3). O *C. difficile* também produz uma segunda toxina, designada toxina B. A toxina B, que foi referida como citotoxina do organismo, é a toxina detetada pelo ensaio de cultura de tecidos atualmente utilizado por muitos laboratórios. As estirpes toxigénicas do *C. difficile* produzem ambas as toxinas, ou apenas a toxina B (4-7). O glutamato desidrogenase do *C. difficile* é um bom marcador de antígeno do organismo em fezes, porque é produzido em grandes quantidades por todas as estirpes, toxigénicas ou não toxigénicas (8-10). O antígeno pode ser detetado em amostras fecais utilizando o teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Um resultado positivo no teste de glutamato desidrogenase do *C. difficile* confirma a presença deste organismo numa amostra fecal; um resultado negativo indica a ausência do organismo. Um resultado positivo no teste de toxinas A e B confirma a presença de *C. difficile* toxigénico.

PRINCÍPIO DO TESTE

O teste de *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* utiliza anticorpos específicos do glutamato desidrogenase e das toxinas A e B do *C. difficile*. O dispositivo contém uma Janela de Reação com três linhas verticais de anticorpos imobilizados. A linha de teste de antígeno ("Ag") contém anticorpos contra a glutamato desidrogenase do *C. difficile*. A linha de controlo ("C") é uma linha pontilhada que contém anticorpos de antiperoxidase de rábano (HRP). A linha de teste de toxinas A e B ("Tox") contém anticorpos contra toxinas A e B do *C. difficile*. O *Conjugado* é composto por anticorpos da glutamato desidrogenase e anticorpos das toxinas A e B acompanhadas de peroxidase de rábano. Para executar o teste, a amostra é adicionada a um tubo contendo uma mistura de *Diluente* e *Conjugado*. A mistura de amostra-conjugado diluída é adicionada ao *Poço de Amostras* e o dispositivo pode incubar à temperatura ambiente durante 15 minutos. Durante a incubação, qualquer glutamato desidrogenase e toxinas A e B da amostra ligam-se aos conjugados peroxidase-anticorpo. Os complexos de conjugado antígenos-anticorpo migram através uma almofada de filtro para uma membrana onde são capturados pela glutamato desidrogenase imobilizada específica e anticorpos específicos das toxinas A e B nas linhas. A *Janela de Reação* é posteriormente lavada com um *Tampão de Lavagem*, seguido pela adição de *Substrato*. Após um período de incubação de 10 minutos, a reação "Ag" é examinada visualmente para verificar o aparecimento de uma linha vertical azul no lado "Ag" da *Janela de Reação*. Uma linha azul indica um teste positivo. Se a "Ag" for positiva, então a reação "Tox" deve ser examinada visualmente para o aparecimento de uma linha azul no lado "Tox" da *Janela de Reação*. Uma linha azul indica um teste positivo. Uma reação positiva em "C", indicada por uma linha azul pontilhada vertical na parte "C" da *Janela de Reação*, confirma que o teste está a funcionar corretamente e os resultados são válidos.

MATERIAIS FORNECIDOS

MEM DEV	***Dispositivos de membrana*** – cada saqueta contém 1 dispositivo
DIL SPE	***Diluente* (22 ml por frasco)** – solução de proteína tamponizada com conjunto de conta-gotas graduado (contém 0,05% de ProClin® 300)*
WASH REAG	***Tampão de Lavagem* (12 ml por frasco)** – solução tamponizada com conjunto conta-gotas graduado (contém 0,05% de ProClin® 300)*
SUBS REAG	***Substrato* (3,5 ml por frasco)** – solução contendo tetrametilbenzidina
CONJ ENZ	***Conjugado* (2,5 ml por frasco)** – anticorpo monoclonal de rato específico para glutamato desidrogenase associado a peroxidase de rábano e anticorpos policlonais de cabra específicos para toxinas A e B associados a peroxidase de rábano numa solução de proteínas tamponizada (contém 0,05% de ProClin® 300)*
CONTROL +	***Controlo positivo* (2 ml)** – antígeno numa solução de proteínas tamponizada

Pipetas de transferência de plástico descartáveis – graduadas em 25 µL, 400 µL e 500 µL

IVD Para utilização com diagnóstico *in vitro*

*Palavra-sinal: Aviso
H317: Pode causar uma reação cutânea alérgica
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Pequenos tubos de ensaio (p. ex., tubos de Eppendorf de plástico ou tubos de vidro)
Sticks de aplicação *Temporizador* *Misturador de vórtice*
Luvas descartáveis para manusear amostras fecais *Pipeta e pontas*

VALIDADE E ARMAZENAMENTO

A data de validade do kit está indicada no rótulo. As datas de validade para cada componente estão listadas nos rótulos individuais. O kit deve ser armazenado entre 2° C e 8° C.

PRECAUÇÕES

1. Reagentes de kits diferentes não devem ser misturados ou trocados. Não utilize um kit após a data de validade.
2. Cada componente do kit deve ser inspecionado relativamente a sinais de fuga. Na chegada, inspecione o kit para garantir que os componentes não estão congelados ou quentes ao toque devido a condições de transporte inadequadas.
3. Coloque todos os componentes À TEMPERATURA AMBIENTE ANTES DE OS UTILIZAR!
4. Os conjuntos de tampas, pontas e conta-gotas estão codificados por cores; NÃO misture nem troque!
5. Não congele os reagentes. O kit deve ser armazenado entre 2° C e 8° C.
6. A bolsa que contém o *Dispositivo de Membrana* deve estar à temperatura ambiente antes da abertura. Mantenha os dispositivos de membrana secos antes de usar.

7. Utilize amostras fecais no espaço de 72 horas após a recolha para obter resultados ideais. As amostras que são congeladas podem perder atividade devido ao congelamento e descongelamento. Se utilizar amostras congeladas, descongele-as à temperatura ambiente.
8. Mantenha os frascos de reagente na vertical quando dispensar os reagentes para garantir um tamanho de gotas consistente e um volume correto.
9. Após a utilização, as amostras e os dispositivos de membrana devem ser tratados e eliminados como potenciais riscos biológicos.
10. Os dispositivos de membrana não podem ser reutilizados.
11. O teste foi otimizado quanto à sensibilidade e à especificidade. As alterações ao procedimento especificado e/ou às condições de teste podem afetar a sensibilidade e a especificidade do teste. Não se desvie do procedimento especificado.
12. Esteja atento ao tempo total do ensaio quando testar mais de uma amostra fecal. Adicione *Diluente* primeiro, seguido de *Conjugado* a cada tubo de *Diluente*. Em seguida, adicione a amostra ao tubo de *Diluente*/*Conjugado*. Misture cuidadosamente todas as amostras diluídas e transfira para o *Dispositivo de Membrana*. A etapa de incubação de 15 minutos começa após a última mistura de amostra-conjugado diluída ter sido transferida para o *Dispositivo de Membrana* final.
13. Se o reagente do *Substrato* mudar para uma cor azul escura/violeta ligue para os serviços técnicos pedindo a substituição.
14. As amostras fecais podem conter agentes potencialmente infeciosos e devem ser manuseados ao "Nível 2 de Biossegurança" conforme recomendado no Manual CDC/NIH "Biossegurança nos Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos."
15. Todos os reagentes destinam-se apenas a utilização para diagnóstico *in vitro*.
16. Use luvas descartáveis quando fizer o teste.
17. Os reagentes contêm 0,05% de ProClin® 300 como conservante. Ainda que a concentração seja baixa, o ProClin® 300 é conhecido por ser nocivo. Em caso de irritação ou erupção cutânea, consulte um médico. Retire o vestuário contaminado e lave antes de utilizar novamente. Manuseie os reagentes de acordo com os regulamentos existentes para segurança laboratorial e boas práticas de laboratório. Estão disponíveis Fichas de Dados de Segurança deste produto mediante pedido; contacte a assistência técnica.
18. Respeite as indicações nacionais, regionais e locais relacionadas com a eliminação de resíduos.

RECOLHA, MANIPULAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS FECAIS

Tipos de Amostras Aceitáveis
Amostras Fecais Frescas
Amostras Fecais Congeladas
Amostras em meios de transporte (Cary Blair, C&S)

Não Utilizar
Amostras fecais em fixador à base de formol (ou seja, acetato de sódio formol, formol a 10 %, mertiolato formol)
Amostras fecais em fixador à base de álcool (ou seja, álcool polivinílico)

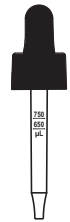
Armazenamento das Amostras Temperatura	Duração aceitável do armazenamento	Comentários
2° C – 8° C	72 horas	As amostras ideais têm menos de 24 horas
Congeladas ≤ -10° C	Mais de 72 horas	Descongelar à temperatura ambiente. Congelar e descongelar várias vezes pode resultar na perda de atividade da amostra devido à degradação de toxinas.

1. Os procedimentos padrão de recolha e manipulação utilizados internamente para amostras fecais são adequados.
2. As amostras fecais devem ser recolhidas em recipientes limpos e à prova de fugas.
3. NÃO se recomenda armazenar as amostras fecais no *Diluente*.
4. Não permita que as amostras fecais permaneçam na mistura de *Diluente*/*Conjugado* durante >24 horas.

PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

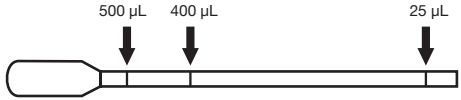
1. Coloque todos os reagentes e o número necessário de dispositivos à temperatura ambiente antes de utilizar. Recomenda-se retirar os reagentes da inserção de espuma para reduzir o tempo necessário para aquecer até à temperatura ambiente.
2. Prepare e rotule um pequeno tubo de ensaio para cada amostra e os controlos externos opcionais, se necessário.
3. Utilize o conjunto do conta-gotas graduado preto, adicione 750 µL (2° graduação a partir da ponta) de Diluente a cada tubo para amostras fecais. **Para amostras em meio de transporte, como Cary Blair ou C&S, adicione 650 µL de (1ª graduação a partir da ponta) *Diluente* ao tubo.**

Tipo de Amostra	Volume de *Diluente*
Amostras Fecais Frescas	750 µL (2ª graduação a partir da ponta)
Amostras Fecais Congeladas (congeladas não diluídas)	750 µL (2ª graduação a partir da ponta)
Amostras em meios de transporte (Cary Blair, C&S)	650 µL (1ª graduação a partir da ponta)
Controlos Externos (positivo e negativo)	750 µL (2ª graduação a partir da ponta)



4. Adicione uma gota de *Conjugado* (frasco com tampa vermelha) a cada tubo.
5. Obtenha uma pipeta de transferência de plástico descartável (fornecida com o kit) para cada amostra - as pipetas têm graduações destacadas de 25 µL, 400 µL e 500 µL.

Pipeta de Transferência Graduada:

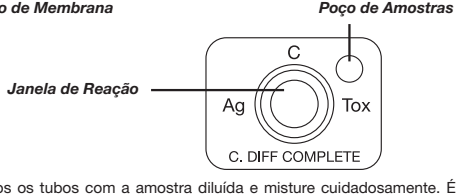


6. **Misture cuidadosamente todas as amostras independentemente da consistência - é essencial que as amostras fiquem uniformemente suspensas antes da transferência.**
   Amostras líquidas/semissólidas – pipete 25 µL de amostra com uma pipeta de transferência e dispense-a para a mistura de *Diluente/Conjugado*. Utilize a mesma pipeta de transferência para misturar a amostra diluída.
   Amostras formadas/sólidas – Tenha cuidado para adicionar a quantidade correta de fezes formadas à mistura da amostra. Misture a amostra cuidadosamente utilizando um stick de aplicação de madeira e transfira uma pequena porção (cerca de 2 mm de diâmetro, o equivalente a 25 µl) da amostra para a mistura Diluente/Conjugado. Emulsione a amostra utilizando o stick de aplicação.
   Amostras fecais nos meios de transporte Cary Blair ou C&S - pipete 100 µL (2 gotas a partir da pipeta de transferência) da amostra para a mistura de *Diluente/Conjugado* .
7. **Amostras de Controlo Externo Opcionais:**
   Controlo Positivo Externo - adicione uma gota de *Controlo Positivo* (frasco com tampa cinzenta) à mistura de *Diluente/Conjugado*.
   Controlo Negativo Externo - adicione 25 µL de *Diluente* à mistura de *Diluente/Conjugado*.

NOTA: Transferir muito pouca amostra, ou falhar na mistura e suspensão completa da amostra na mistura de Diluente/Conjugado, pode produzir um resultado de teste falso negativo. A adição de amostra fecal em excesso pode causar resultados inválidos devido ao fluxo de amostra limitado.

PROCEDIMENTO DE TESTE

1. Obtenha um *Dispositivo de Membrana* por amostra e um dispositivo por controlo negativo ou positivo externo opcional, conforme necessário. Os sacos de papel de alumínio que contêm os dispositivos devem ser colocados à temperatura ambiente antes da abertura. Utilize o dispositivo imediatamente após a abertura. Rotule cada dispositivo adequadamente e oriente-o numa superfície plana de forma a que a impressão "C. DIFF COMPLETE" esteja na parte inferior do dispositivo, e o Poço de Amostras pequeno esteja localizado no canto superior direito do dispositivo.



2. Feche todos os tubos com a amostra diluída e misture cuidadosamente. É possível atingir uma mistura adequada agitando em vórtice ou invertendo o tubo. Assim que uma amostra de doente ou *Controlo Positivo* tiver sido diluída na mistura de *Diluente/Conjugado*, pode ser incubada à temperatura ambiente por qualquer período até 24 horas antes de adicionar ao *Dispositivo de Membrana*.
3. Utilizando uma pipeta de transferência nova, transfira 500 µL da mistura de amostra-conjugado diluída para o ***Poço de Amostras*** (orifício mais pequeno no canto superior direito do dispositivo) de um *Dispositivo de Membrana*, tornando certa a expulsão da amostra de líquido para a almofada de drenagem dentro do *Dispositivo de Membrana*. Quando carregar a amostra para o poço de amostras, certifique-se de que a ponta da pipeta de transferência está oblíqua em relação à *Janela de Reação* (orifício maior no meio do dispositivo).
4. Incube o dispositivo à temperatura ambiente durante 15 minutos – a amostra penetrará através do dispositivo e uma área húmida espalhar-se-á ao longo da *Janela de Reação*.

NOTA PARA AMOSTRAS QUE NÃO MIGRAM:
Ocasionalmente, uma amostra diluída não migra corretamente e a Janela de Reação não se molha totalmente. Se a Janela de Reação não parecer estar completamente molhada no espaço de 5 minutos após a adição da amostra ao Poço de Amostras, então adicione 100 µl (4 gotas) de Diluente ao Poço de Amostras e espere mais 5 minutos (num total de 20 minutos).

5. Após a incubação, adicione 300 µL de *Tampão de Lavagem* à ***Janela de Reação*** utilizando o conjunto do conta-gotas branco graduado. Permita que o *Tampão de Lavagem* flua através da membrana da Janela de Reação e seja totalmente absorvido.
6. Adicione 2 gotas de *Substrato* (frasco com tampa branca) à ***Janela de Reação***. Leia e registe os resultados visualmente após 10 minutos.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

1. A interpretação do teste é mais fiável quando o dispositivo é lido imediatamente no final do período de reação de 10 minutos. Leia o dispositivo a uma distância de trabalho normal numa área bem iluminada. Veja com uma linha de visão diretamente sobre o dispositivo.
2. Observe o dispositivo quanto ao aparecimento de pontos azuis no meio da *Janela de Reação* representando o controlo positivo interno. O aparecimento de qualquer(quaisquer) ponto(s) de controlo representa um controlo interno válido. O fundo pode aparecer com cor branca a azul clara. Observe o dispositivo quanto ao aparecimento de linhas azuis nos lados "Ag" e "Tox" da *Janela de Reação* representando as linhas de teste. As linhas podem aparecer com uma intensidade ténue a escura.
3. **Resultado de Antígeno Positivo ("Ag"):** Um resultado positivo de antígeno pode ser interpretado a qualquer altura entre a adição de *Substrato* e os 10 minutos de tempo de leitura. Para um resultado positivo de antígeno, a linha "Ag" azul e a linha de controlo azul pontilhada abaixo de "C" estão visíveis (Figura 1a). As linhas podem aparecer com uma intensidade ténue a escura. Uma linha parcial óbvia é interpretada como um resultado positivo. Não interprete a descoloração da membrana como um resultado positivo. Um resultado positivo indica a presença de *C. difficile*.
4. **Resultado Positivo de Antígeno e Toxinas ("Tox"):** Se o resultado do antígeno for positivo (ou seja, uma linha "Ag" azul e um controlo azul pontilhado abaixo de "C" forem visíveis), avance para a interpretação do resultado da toxina. Um resultado positivo de toxina pode ser interpretado a qualquer altura entre a adição de *Substrato* e os 10 minutos de tempo de leitura. Para um resultado de toxina positivo, estará visível uma linha "Tox" azul (Figura 1b). As linhas podem aparecer com uma intensidade ténue a escura. Uma linha parcial óbvia é interpretada como um resultado positivo. Não interprete a descoloração da membrana como um resultado positivo. Um resultado positivo indica a presença de toxina de *C. difficile*.
5. **Resultado Negativo:** um teste não pode ser interpretado como negativo ou inválido até 10 minutos após a adição de *Substrato*. Uma linha azul pontilhada simples está visível no meio da *Janela de Reação,* abaixo de "C" e nenhuma linha de teste está visível no lado "Ag" ou no lado "Tox" da *Janela de Reação* (Figura 1c). Um resultado negativo na porção de antígeno indica que o antígeno de *C. difficile* está ausente da amostra ou está abaixo do limite de deteção do teste. Um resultado negativo na porção de toxina indica que a toxina de C. difficile está ausente da amostra ou está abaixo do limite de deteção do teste.
6. **Resultado Inválido:** não está visível nenhuma linha na Janela de Reação (Figura 1d). O resultado do teste é inválido se uma linha pontilhada azul não estiver presente abaixo de "C" no fim do período de reação (Figuras 1e, 1f, 1g).
7. **Antígeno Negativo ("Ag"), Toxina Positiva ("Tox"):** Uma percentagem baixa de amostras pode ter resultado negativo para o antígeno mas positivo para a toxina. Estas amostras devem ser consideradas como indeterminadas e testadas novamente utilizando uma amostra fresca (Figura 1h). Se a amostra for testada novamente com resultado negativo para o antígeno mas positivo para a toxina, registe como resultado de toxina positivo.

FIGURA 1: INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS DO *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

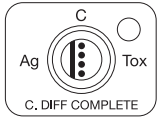


Figura 1a
Resultado de Antígeno Positivo

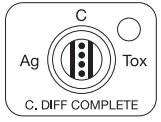


Figura 1b
Resultado de Antígeno e Toxina Positivo

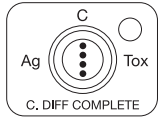


Figura 1c
Resultado Negativo

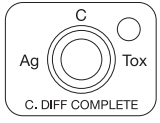


Figura 1d
Resultado Inválido

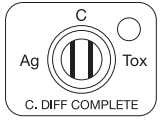


Figura 1e
Resultado Inválido

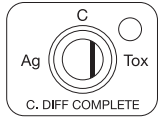


Figura 1f
Resultado Inválido

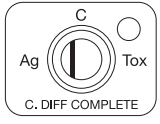


Figura 1g
Resultado Inválido

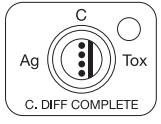


Figura 1h
Ver #7 para Interpretação

CONTROLO DE QUALIDADE

Interno: uma linha pontilhada azul deve estar visível no meio da *Janela de Reação*, abaixo de "C" em cada *Dispositivo de Membrana* testado. O aparecimento dos pontos de controlo azuis confirma que a amostra e os reagentes foram adicionados corretamente, que os reagentes estavam ativos no momento da realização do ensaio e que a amostra migrou corretamente através do *Dispositivo de Membrana*. Também confirma a reatividade dos outros reagentes associados ao ensaio. Um fundo claro na área de resultados é considerado um controlo negativo interno. Se o teste tiver sido realizado corretamente e os reagentes estiverem a funcionar adequadamente, o fundo será branco para dar um resultado percetível. **Externo:** a reatividade do kit *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* deve ser verificada assim que o receber utilizando o *Controlo Positivo* e o controlo negativo (*Diluente*). O *Controlo Positivo* é fornecido com o kit (frasco com tampa cinzenta). O *Controlo Positivo* confirma a reatividade dos outros reagentes associados ao ensaio e não se destina a assegurar precisão no corte analítico do ensaio. Utiliza-se *diluente* para o controlo negativo. Podem ser realizados testes adicionais com os controlos para cumprir as exigências dos regulamentos locais, estatais e/ou federais e/ou das organizações acreditadas.

LIMITAÇÕES

1. O teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* é utilizado para detetar o antígeno e a(s) toxina(s) do C. difficile em amostras fecais. O teste confirma a presença da toxina nas fezes e esta informação deve ser tomada em consideração pelo médico à luz do histórico clínico e do exame físico do doente. O teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* detetará níveis de toxina A a ≥0,63 ng/ml, toxina B a ≥0,16 ng/ml e glutamato desidrogenase a ≥0,8 ng/ml.
2. As amostras fecais são extremamente complexas. Os resultados ideais com o teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* são obtidos com as amostras que têm menos de 24 horas. As amostras mais diluídas podem ser armazenadas entre 2° C e 8° C durante 72 horas antes de se observar uma degradação significativa da toxina. Se as amostras não forem testadas dentro deste período de tempo, podem ser congeladas e descongeladas. No entanto, repetidos congelamentos e descongelamentos podem resultar em perda de imunorreatividade de antígenos e toxinas A e B.
3. Algumas amostras podem dar reações fracas. Isto pode acontecer devido a uma série de fatores como a presença de baixos níveis de antígeno e/ou de toxina, a presença de substâncias aglutinantes ou enzimas inativadoras nas fezes. As linhas podem aparecer com uma intensidade ténue a escura. Estas amostras devem ser reportadas como positivas se se observar qualquer linha azul, mesmo que seja parcial. Uma linha azula parcial óbvia é interpretada como um resultado positivo.
4. Não podem ser utilizadas amostras fecais preservadas em formol a 10 %, mertiolato formol, acetato de sódio formol ou álcool polivinílico.
5. O teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* é qualitativo. A intensidade da cor não deve ser interpretada quantitativamente.
6. Alguns isolados de *C. sordellii* podem reagir no teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* devido à produção de toxinas imunologicamente relacionadas (1).
7. Foram reportadas em crianças taxas de colonização até 50 %. Uma taxa elevada foi também relatada em doentes com fibrose cística (1,3). Os resultados podem aparecer positivos nestes grupos, mas devem ser vistos juntamente com o potencial de serem um transportador colonizado.
8. O único organismo não *C. difficile* que reage na porção de toxina do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* foi o *Clostridium sordellii* VPI 9048. Esta estirpe produz toxinas HT e LT, que são homólogas às toxinas A e B, respetivamente.
9. Não existem dados sobre os efeitos de lavagens intestinais, enemas de bário, laxantes ou preparações para os intestinos no desempenho do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*. Todos estes procedimentos podem resultar na diluição extensiva ou na presença de aditivos que podem afetar o desempenho do teste.

VALORES ESPERADOS

A doença *Clostridium difficile* é essencialmente uma doença nosocomial de doentes idosos, e a frequência da doença depende de fatores como a população de doentes, o tipo de instituição e a epidemiologia. A incidência reportada da doença *C. difficile* em doentes com diarreia associada a antibióticos pode variar de 5 a 20 % e os hospitais podem experimentar taxas menores ou maiores do que este intervalo. É importante considerar quaisquer resultados de teste em conjunto com sintomas clínicos porque alguns adultos saudáveis e um grande número de crianças saudáveis (até 50 %) terão um resultado positivo para a toxina de *C. difficile*. Para além disso, foram reportadas taxas de transporte de 22 % a 32 % do *C. difficile* em doentes com fibrose cística (1,3). Em estudos levados a cabo para este dispositivo, utilizando doentes sintomáticos, a incidência de toxinas A e B foi de 12 % e de GDH foi de 18 %. Um resultado positivo na porção de antígeno do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* confirma a presença de *C. difficile* numa amostra fecal; um resultado negativo indica a ausência do organismo. Um resultado positivo na porção da toxina do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* confirma a presença de *C. difficile* numa amostra fecal; um resultado negativo indica a ausência da toxina ou níveis insuficientes de toxina para deteção.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Avaliação clínica da porção de antígeno do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

A porção de antígeno do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* foi comparada com a cultura bacteriológica. As amostras incluídas na avaliação foram apresentadas aos laboratórios clínicos para ensaios de rotina. O teste de cultura bacteriológica foi realizado de acordo com procedimentos internos. Os resultados estão exibidos na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo do desempenho clínico comparando o teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* com a cultura bacteriológica

n = 1126	Cultura Bacteriológica Positiva	Cultura Bacteriológica Negativa
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linha de Antígeno Positiva	201	62
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linha de Antígeno Negativa	21	842

		Limites de Confiança 95 %
Sensibilidade	90,5%	85,7 – 93,9
Especificidade	93,1%	91,2 – 94,7
Valor Preditivo Positivo	76,4%	70,7 – 81,3
Valor Preditivo Negativo	97,6%	96,2 – 98,4
Correlação	92,6%	91,8 – 93,4

Foram avaliadas amostras discrepantes usando testes ELISA para glutamato desidrogenase de *C. difficile*.
Vinte e nove das 62 amostras com resultado positivo falso foram positivas noutro teste de GDH e foram consideradas positivas verdadeiras.
Treze das 21 amostras com resultado negativo falso foram negativas noutro teste de GDH e foram consideradas negativas verdadeiras.

A porção de antígeno do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* foi comparada com o ensaio de cultura de tecidos para a deteção da toxina de C. difficile. As amostras incluídas na avaliação foram apresentadas aos laboratórios clínicos para ensaios de rotina. Os resultados são mostrados na Tabela 2. A porção de antígeno do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* detetou 98,7 % das amostras positivas de cultura de tecidos.

Tabela 2. Resumo do desempenho clínico comparando o teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* com o ensaio de cultura de tecidos

n = 1126	Cultura de Tecidos Positiva	Cultura de Tecidos Negativa
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linha de Antígeno Positiva	154	109
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linha de Antígeno Negativa	2	861

Avaliação clínica da porção de toxina do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*

A porção de toxina do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* foi comparada com o ensaio de cultura de tecidos em dois laboratórios clínicos e internamente no TECHLAB®, Inc. As amostras incluídas na avaliação foram apresentadas aos laboratórios clínicos para ensaios de rotina. Os resultados estão exibidos na Tabela 3.

Tabela 3. Resumo do desempenho clínico comparando o teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* com o ensaio de cultura de tecidos

n = 1126	Cultura de Tecidos Positiva	Cultura de Tecidos Negativa
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linha de Toxina Positiva	137	6
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linha de Toxina Negativa	19	964

		Limites de Confiança 95 %
Sensibilidade	87,8%	81,4 - 92,3
Especificidade	99,4%	98,6 - 99,7
Valor Preditivo Positivo	95,8%	90,7 - 98,3
Valor Preditivo Negativo	98,1%	96,9 - 98,8
Correlação	97,8%	97,6 - 98,0

As amostras discrepantes foram avaliadas usando testes ELISA atuais para as toxinas A e B.
Cinco das 6 amostras com resultado positivo falso tiveram resultado positivo no teste ELISA e foram consideradas positivas verdadeiras.
Doze das 19 amostras com resultado negativo falso tiveram resultado negativo pelo teste ELISA e foram consideradas negativas verdadeiras.

EFEITO DA CONSISTÊNCIA DA AMOSTRA FECAL

Efeito da consistência da amostra fecal no teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

A reação das amostras fecais de consistências diferentes na porção de antígeno (n=978) e na porção de toxina (n=981) do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® é mostrada nas Tabelas 4 e 5. As percentagens das reações positivas utilizando um ensaio de cultura ou um teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® foram similares em todos os três tipos de amostras fecais (líquidas, semissólidas e sólidas). Todas as amostras foram submetidas ao teste de C. difficile. A base da apresentação foi o histórico clínico do doente e não a consistência da amostra. Na porção do antígeno, os resultados mostram que o teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teve resultados similares à cultura bacteriológica ao testar amostras de consistências diferentes. Na porção da toxina, os resultados mostram que o teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® teve resultados similares à cultura bacteriológica ao testar amostras de consistências diferentes.

Tabela 4. Reação de amostras fecais de diferentes consistências na porção de antígeno do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Número de amostras (n = 978)	Amostras Líquidas (n = 335)	Amostras semissólidas (n = 522)	Amostras Sólidas (n = 121)
Positivo para ensaio de cultura bacteriológica	59 (17,6%)	110 (21,1%)	19 (15,7%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linha de Antígeno Positiva	72 (21,5%)	128 (24,5%)	25 (20,7%)
Negativo para ensaio de cultura bacteriológica	276 (82,4%)	412 (78,9%)	102 (84,3%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linha de Antígeno Negativa	263 (78,5%)	394 (75,5%)	96 (79,3%)

Tabela 5. Reação de amostras fecais de diferentes consistências na porção de toxina do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®

Número de amostras (n = 981)	Amostras Líquidas (n = 336)	Amostras semissólidas (n = 523)	Amostras Sólidas (n = 122)
Positivo para ensaio de cultura de tecido	43 (12,8%)	81 (15,5%)	8 (6,6%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linha de Toxina Positiva	42 (12,5%)	72 (13,8%)	7 (5,7%)
Negativo para ensaio de cultura de tecido	293 (87,2%)	442 (84,5%)	114 (93,4%)
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® Linha de Toxina Negativa	294 (87,5%)	451 (86,2%)	115 (94,3%)

SENSIBILIDADE ANALÍTICA

O corte para o ensaio foi estabelecido em concentrações de 0,63 ng/ml para a toxina A, 0,16 ng/ml para a toxina B e 0,8 ng/ml para a glutamato desidrogenase.

REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® foi determinada utilizando 12 amostras fecais que foram codificadas para evitar a sua identificação durante o teste. O teste foi efetuado em 3 laboratórios independentes, que testaram as amostras durante 3 dias. As amostras produziram os resultados esperados 100 % das vezes.

REATIVIDADE CRUZADA

As amostras fecais inoculadas com os microrganismos seguintes a uma concentração final de aproximadamente 10^8 organismos ou superior por ml não reagiram na porção de antígeno ou toxina do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®:

Bactéria ou Patogénio: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, Clostridium clostridiforme, Clostridium haemolyticum, Clostridium histolyticum, Clostridium novyi, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (não toxigénico)*, Clostridium sporogenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* EIEC*, Escherichia coli, Escherichia coli* O157:H7*, Escherichia coli ETEC, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia liquifaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* (Cowans)*, Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

O único organismo não*C. difficile* que reage na porção de toxina do teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*® foi o *Clostridium sordellii*VPI 9048. Esta estirpe produz toxinas HT e LT, que são homólogas às toxinas A e B, respetivamente.

Os vírus seguintes de $10^{3,3}$ to $10^{8,25}$ unidades TCID por 0,2 ml não reagiram no teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®:

Vírus: Tipos de adenovírus 1, 2, 3, 5, 40, 41, coronavírus humanos, vírus de Coxsackie B2, B3, B4, B5, Ecovírus 9, 11, 18, 22, 33, tipo de Enterovírus 68, 69, 70, 71, Rotavírus.

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

As seguintes substâncias (formulação dos EUA) não tiveram nenhum efeito sobre os resultados dos testes quando presentes nas fezes nas concentrações indicadas: mucina (3,5 % p/v), sangue humano (40 % v/v), sulfato de bário (5 % p/v), Imodium® (5 % v/v), Kaopectate® (5 % v/v), Pepto-Bismol® (5 % v/v), ácido esteárico/palmítico (40 % p/v), Metronidazol (0,25 % p/v), Vancomicina (0,25 % p/v).

REAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS OBTIDA EM GELOSE CICLOSERINA CEFOXITINA-FRUTOSE (CCFA)

Testou-se um total de 103 isolados clínicos de *C. difficile*, obtidos por cultura bacteriológica anaeróbica em CCFA após 3 dias a 37° C, no teste *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*®. Para a análise, as colónias individuais foram escolhidas e suspensas em *Diluente* conforme recomendado para amostras fecais. Todos os 103 isolados tiveram uma reação de antígeno positiva no teste.

Setenta dos 103 isolados (68 %) resultaram de amostras fecais que tiveram um resultado positivo para a toxina do *C. difficile* por ensaio de cultura de tecido. Destes, 56 (80 %) tiveram uma reação de toxina positiva quando filtrados após o crescimento anaeróbico em CCFA durante 3 dias a 37° C.

REFERENCES / REFERENCIAS / LITERATURHINWEISE / RÉFÉRENCES / LITERATURA / REFERENCER / ВІВЛІОГРАФІА / REFERENCIÁK / BIBLIOGRAFIA / REFERENTIES / REFERANSER / REFERANSER / REFERANSLAR / ССЫЛКИ / REFERÊNCIAS

1. Lyerly, D. M., H. C. Krivan, and T. D. Wilkins. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. **1**: 1-18.
2. Lyerly, D. M., K. E. Saum, D. K. MacDonald, and T. D. Wilkins. 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. Infect. Immun. **47**: 349-352.
3. Borriello, S. P., F. E. Barclay, A. R. Welch, J. M. Ketley, T. J. Mitchell, J. Stephen, and G. E. Griffin. 1985. Host and microbial determinants of the spectrum of *Clostridium difficile* mediated gastrointestinal disorders. Microecol. Ther. **15**: 231- 236.
4. Lyerly, D. M., N. M. Sullivan, and T. D. Wilkins. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Clostridium difficile* toxin A. J. Clin. Microbiol. **17**: 72-78.
5. Laughon, B. E., R. P. Viscidi, S. L. Gdovin, R. H. Yolken, and J. G. Bartlett. 1984. Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. J. Infect. Dis. **149**: 781-788.
6. Lyerly, D. M., L. A. Barroso, and T. D. Wilkins. 1992. Characterization of a toxin A-/toxin B+ isolate of *Clostridium difficile*. Infect. Immun. **60**: 4633-4639.
7. Dove, C. H., S. Z. Wang, S. B. Price, C. J. Phelps, D. M. Lyerly, T. D. Wilkins, and J. L. Johnson. 1990. Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. Infect. Immun. **58**: 480-488.
8. Zheng, L., S. F. Keller, D. M. Lyerly, R. J. Carman, C. W. Genheimer, C. A. Gleaves, S. J. Kohlhepp, S. Young, S. Perez, and K. Ye. 2004. Multicenter Evaluation of a New Screening Test that Detects *Clostridium difficile* in Fecal Specimens. J. Clin. Microbiol. **42**: 3837-3840.
9. Miles, B. L., J. A. Siders, and S. D. Allen. 1988. Evaluation of a commercial latex test for *Clostridium difficile* for reactivity with *C. difficile* and cross-reactions with other bacteria. J. Clin. Microbiol. **26**: 2452-2455.
10. Lyerly, D. M., and T. D. Wilkins. 1986. Commercial latex test for *Clostridium difficile* Toxin A does not detect Toxin A. J. Clin. Microbiol. **23**: 622-623.

Developed and Manufactured by:

TECHLAB®

TECHLAB, Inc.
2001 Kraft Drive
Blacksburg, VA 24060-6358, USA

CE EC REP

Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH The Hague
The Netherlands

Distributed by:

Alere™

Alere North America, LLC
30 South Keller Road
Orlando, Florida 32810
TEL 1-877-441-7440
1-321-441-7200 OUTSIDE USA

Technical Support

Advice Line

Further information can be obtained from your distributor, or by contacting Alere Technical Support on:

US	+1 877 866 9335	TS.SCR@alere.com
Africa, Russia, CIS	+972 8 9429 683	ARCISproductsupport@alere.com
Asia Pacific	+61 7 3363 7711	APproductsupport@alere.com
Canada	+1 800 818 8335	CANproductsupport@alere.com
Europe & Middle East	+44 161 483 9032	EMEproductsupport@alere.com
Latin America	+57 2 6618797	LAproductsupport@alere.com

Made in the USA.
© 2016 TECHLAB, Inc. All rights reserved.
The Alere Logo and Alere are trademarks of the Alere group of companies.
C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE, the TECHLAB Logo, and TECHLAB are trademarks of TECHLAB Inc., under license.
ProClin is a trademark of Rohm and Hass Company.
RMS #91-T525C-01 Issued: 2016/07