TECHLAB ® C. DIFF CHEK™ - 60

An ELISA for the detection of *Clostridium difficile* Antigen
Catalog No. T5025 (96 Tests)
IVD *In Vitro* Diagnostic Medical Device

ESPAÑOL p. 10
Una ELISA para la detección del antígeno del
Clostridium difficile
N° de catálogo T5025 (96 ensayos)
IVD Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*

DEUTSCH p. 19
Ein ELISA für den Nachweis von
Clostridium difficile-Antigen
Katalognr. T5025 (96 Tests)
IVD *In-Vitro*-Diagnostikum

FRANCAISE p. 29
Un test ELISA pour le dépistage de l'antigène
Clostridium difficile
Catalogue N° T5025 (96 test)
IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

Made in the USA

Developed and Manufactured by:

TECHLAB®

2001 Kraft Drive
Blacksburg, VA 24060-6358 USA

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

C. DIFF CHEK™ - 60

INTENDED USE

The *C. DIFF CHEK™ - 60* test is an enzyme immunoassay for use as a screening test to detect *Clostridium difficile* antigen, glutamate dehydrogenase, in fecal specimens from persons suspected of having *C. difficile* disease. The test does not distinguish toxigenic from nontoxigenic strains of *C. difficile*. With the use of additional tests that detect *C. difficile* toxins, this 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 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. The disease results from the toxins that the toxigenic organism produces. 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 (4,5,6,7). 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 (8-11). The antigen can be detected in fecal specimens by using the *C. DIFF CHEK™ - 60* test. A positive result in the test, which is highly specific 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 should be followed by a toxin-specific test to confirm the presence of toxigenic *C. difficile*.

PRINCIPLE OF THE TEST

The *C. DIFF CHEK™ - 60* test uses antibodies specific for the glutamate dehydrogenase of *C. difficile*. The *Microassay Plate* supplied with the kit contains immobilized polyclonal antibody against the antigen. The *Conjugate* consists of a highly specific monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase. In the assay, an aliquot of a fecal specimen is emulsified in the *Diluent* and the diluted specimen is transferred to the microwell containing the *Conjugate*. If the antigen is present in the specimen, it will bind to the *Conjugate* and to the immobilized polyclonal antibody during the incubation phase. Any unbound material is removed during the washing steps. Following the addition of *Substrate*, a color is detected due to the enzyme-antibody-antigen complexes that form in the presence of antigen.

MATERIALS PROVIDED

DIL | SPE — ***Diluent* (40 mL)** – buffered protein solution containing preservative*

CONJ | ENZ — ***Conjugate* (7 mL)** – antigen-specific mouse monoclonal antibody coupled to horseradish peroxidase, in a buffered protein solution (contains 0.05% ProClin® 300)



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

SUBS | REAG — ***Substrate* (14 mL)** – solution containing tetramethylbenzidine and peroxide

CONTROL + ***Positive Control* (4.5 mL)** – antigen in a buffered protein solution containing preservative

WASHBUF 20X ***Wash Buffer Concentrate* (50 mL)** – 20X Concentrate containing phosphate-buffered saline, detergent and 0.2% thimerosal*
Signal Word: Warning
H373: May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure P260, P314, P501



H_2SO_4 0.6N ***Stop Solution* (7 mL)** – 0.6 N Sulfuric acid. CAUTION: Avoid contact with skin; flush with water immediately if contact occurs
Signal Word: Danger
H314: Causes severe skin burns and eye damage
P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501



MA PLT ***Microassay Plate*** – 12 strips, each consisting of 8 wells coated with antibody specific for antigen

*contains mercury



IVD FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE

ACCESSORIES

Applicator Sticks (50)
Plastic adhesive sheets (2)
Disposable plastic pipettes (100)
Wash Solution Label (1)

OPTIONAL

FECAL-QUIK PREP® devices (96)

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Wash bottle *Timer* *Paper towels or absorbent sheets*
Discard container *Distilled water* *Vortex mixer*
Microplate Reader (Spectrophotometer) - capable of reading dual wavelength at 450/620 nm or single wavelength at 450 nm (a dual wavelength plate reader is recommended; absorbances should be measured at 450 nm and Referenced at 620 nm)
Refrigerator - set between 2° and 8°C *Incubator* - set at 37°C ± 2°C

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 containing the reagents with designated shelf life should be stored between 2° and 8°C and should be returned to the refrigerator as soon as possible after use.

PRECAUTIONS

1. Reagents from different kits should not be mixed. 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.
3. Reagents should be at room temperature before use.
4. Caps and tips are color-coded; do NOT mix!
5. When handling microwells, avoid scratching the bottom of the wells because this may result in elevated absorbance readings.
6. Hold dropper bottles vertically to ensure proper drop size.
7. Handle specimens and used microwells as if capable of transmitting infectious agents. Wear gloves when doing the test.
8. The *20X Wash Buffer Concentrate* contains 0.2% Thimerosal as a preservative. Once diluted to normal use concentration this solution is classified as non-hazardous.

9. The *Stop Solution* contains 0.6 N sulfuric acid. Flush with water immediately if contact occurs.
10. *Unused microwells must be placed back inside of the resealable pouch with the desiccant to protect them from moisture*. Check the desiccant pack before using the microwells. The color indicator on the desiccant pack should be blue. If the color turns pink, the quality of the microwells may be compromised. Please do not use the microwells stored with pink desiccant.
11. Specimens that have been preserved in 10% Formalin, merthiolate formalin, sodium acetate formalin, or polyvinyl alcohol, or specimens that are in transport media such as Cary Blair or C&S cannot be used.
12. Perform the washing procedure as directed to avoid high background reactions.
13. Use fecal specimens within 72 hours of collection to obtain optimal results. Specimens that are frozen (≤ -10°C) may lose activity due to freezing and thawing.
14. The *Substrate* is light sensitive and should be protected from direct sunlight or UV sources. The appearance of the reagent should be clear and colorless.
15. 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.
16. Optimal results are obtained by following the specified test procedure. The concentrations, incubation conditions, and processing specifications have been optimized for sensitivity and specificity. Alterations of the specified procedure and/or test conditions may affect the sensitivity and specificity of the test.
17. The *Conjugate* 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.
18. 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.
19. Follow your national, regional, and local ordinances accordingly for waste disposal regulations. Do not place in trash, dispose of as hazardous waste.

COLLECTION AND HANDLING OF FECAL SPECIMENS

NOTE: Standard collection and handling procedures used in-house for fecal specimens are appropriate. Specimens should be stored between 2° and 8°C. Whenever possible, test specimens that are less than 24 hours old. Freeze the specimens (≤ -10°C) if the test cannot be performed within 72 hours of collection. Freezing and thawing of the specimen, especially multiple times, results in loss of activity due to degradation of the antigen. Fecal specimens that have been preserved in 10% Formalin, merthiolate formalin, sodium acetate formalin, or polyvinyl alcohol, or specimens that are in transport media such as Cary Blair or C&S cannot be used. Perform the washing procedure as directed to avoid high background reactions. Make sure that specimens are thoroughly mixed (vortexed) prior to performing the assay. This includes complete mixing of the specimen prior to transfer to *Diluent* as well as complete mixing of the diluted specimen prior to transfer to the microwell. Storing of fecal specimens in the *Diluent* is **not** recommended. Test immediately once the fecal specimen is diluted in *Diluent*. Disposable pipettes included in the accessories are graduated at 50, 100, 200, and 300 µL.

1. Set up one dilution tube for each specimen to be tested. Add 200 µL *Diluent* to each tube. *Label the tube directly on the side*.
2. For **formed fecal specimens**, use an applicator stick to transfer the fecal specimen to the tube. Transfer an amount equal to about 3 mm in diameter with the applicator stick to the *Diluent*. For **liquid fecal specimens**, use a plastic pipette to transfer 50 µL specimen to the tube. Make sure the liquid specimens are evenly suspended (vortexed) before transferring.
3. Vortex the tubes for 10 seconds before transferring the diluted specimen to the microwell. This ensures thorough mixing of the specimen.

4. Automated equipment or semi-automated washing equipment may be used with speci-mens that have been centrifuged (5000 x g for 10 minutes) to remove particulate matter. Double the amount of fecal specimen and the amount of *Diluent* to ensure sufficient supernatant for testing.

COLLECTION AND HANDLING OF FECAL SPECIMENS WHEN USING THE OPTIONAL *FECAL-QUIK-PREP*® DEVICE

Note: This procedure should be followed immediately after obtaining the fecal specimen.

1. Hold the *FECAL-QUIK-PREP*® device with the red stick upright (vertically). Remove the swab from the plastic sleeve.
2. For **formed fecal specimens**, coat the swab with specimen equal to about 3mm in diameter. For **liquid fecal specimens**, place the swab into the specimen, and allow the swab to absorb sample for a minimum of 10 seconds.
3. Insert the fecal specimen-coated swab into the plastic sleeve. Make sure the swab is all the way into the sleeve. Hold the device vertically.
4. Bend the upper chamber containing diluent, snapping the red stick. Squeeze the upper chamber bulb to force all of the diluent onto the swab in the sleeve.
5. Carefully loosen the swab from the sleeve, and while keeping the swab in the sleeve, gently spin the swab to mix the fecal specimen and diluent.
6. Tighten the swab back into the plastic sleeve.
7. Make certain that the white cap on the bottom of the device is securely tightened.
8. Pinch the bottom chamber and release. This pulls the diluted specimen through the filter. Repeat if necessary. The diluted sample must be assayed immediately after dilution.

PRELIMINARY PREPARATIONS

1. **IMPORTANT:** All reagents must be at room temperature prior to use in the assay.
2. **Prepare 1X *Wash Solution*.** The *Wash Buffer Concentrate* is supplied as a 20X concentrate (a precipitate may be noticed). It should be diluted to a total volume of 1 liter by adding 50 mL of the concentrate to 950 mL of distilled water. Label the bottle. Store any unused 1X *Wash Solution* between 2° and 8°C.
3. **Assay Strip Preparation.** Each strip contains 8 wells coated with polyclonal antibodies specific for *C. difficile* antigen. Each specimen or control will employ one of these coated wells. Determine the number of wells to be used. Avoid contact with the base of the wells. Microwells not used must be returned to the resealable bag with desiccant and carefully resealed in the bag.

TEST PROCEDURE

1. Add 1 drop (50 µL) of *Conjugate* (red cap) to each well. Be sure to hold each bottle vertically when adding the drops. Use 1 well for each fecal specimen, 1 well for the positive control and 1 well for the negative control. Identification marks may be written directly on side of well.

2(a). Transfer 100 µL (2 drops using a transfer pipette from the accessory kit) of diluted specimen to the microwell. Add 1 to 2 drops (50 to 100 µL) of the *Positive Control* (black cap) to the positive control well and 1 to 2 drops (50 to 100 µL) of the *Diluent* (negative control) to the negative control well. Gently tap to mix.
Note: If using semi-automated or automated washing equipment, specimens must be centrifuged (5000 x g for 10 minutes) to remove particulate matter.

2(b). **If using a *FECAL-QUIK-PREP*® device** - Hold the device horizontally and remove the white cap to vent. Hold over the assay well containing conjugate, turn upright and squeeze the bottom chamber to deliver **three** drops of diluted specimen to each assay well. Add 1 to 2 drops (50 to 100 µL) of the *Positive Control* (black cap) to the positive control well and 1 to 2 drops (50 to 100 µL) of the *Diluent* (negative control) to the negative control well.

3. Cut the adhesive plastic sheet to the size necessary to cover the wells. Cover the wells and incubate them at 37°C ± 2°C for 50 minutes.

4. Shake out the contents of the microwells into a discard pan.
5. Wash each well using the 1X *Wash Solution* in a squirt bottle with a fine-tipped nozzle, directing the *Wash Solution* to the bottom of the well with force. Fill the wells, then shake the *Wash Solution* out of the well into a discard pan. Slap the inverted plate on a dry paper towel.
6. Repeat step 5 **four times** using a dry paper towel each time. If any particulate matter is seen in the wells, continue washing until all the particulate matter is removed. **Note**: If using semi-automated or automated washing equipment, add 350 µL of 1X *Wash Solution* to each well. Wash for a total of **7** times. If particulate matter is seen in the well, continue washing until all particulate matter is removed.
7. After washing, completely remove any residual liquid in the wells by striking the plate once again onto a dry paper towel until no liquid comes out. *Dispose of paper towels & specimen containers properly.*
8. Add 2 drops (100 µL) of *Substrate* (blue cap) to each well. Gently tap the wells to mix the substrate. Incubate the wells at room temperature for 10 minutes. Gently tap the wells at 5 minutes.
9. Add 1 drop (50 µL) of *Stop Solution* (yellow cap) to each well. The addition of the *Stop Solution* converts the blue color to a yellow color that may be quantitated by measuring the optical density at 450 nm on a microassay plate reader. The instrument should be blanked against air. If a dual wavelength reader is used, blank against air at 620 nm and read at 450 nm. Wipe the underside of each well before measuring the optical density. If a microassay plate reader is unavailable, the test may be read visually in good light against a white background. Read within two to ten minutes after adding *Stop Solution*.

OPTIONAL TEST PROCEDURE/RAPID FORMAT

Perform the regular test procedure according to the instructions provided above replacing the 50 minute incubation at 37°C ± 2°C with 20 minutes at 37°C using the *Stat Fax 2200 Incubator/Shaker* or equivalent incubator/shaker. If the *Stat Fax 2200 Incubator/Shaker* is used, set the shaker to speed 7 and the temperature to 37°C. If other shakers are used, a speed of 1500 rpm is recommended. Shaking should not cause spillage. If spillage occurs, reduce the speed accordingly (12).

QUALITY CONTROL

1. A positive and negative control must be run with each series of test specimens.
2. Positive and negative controls must fall in their respective ranges or the test is not valid.
   a) Positive Control must be a visible yellow color.
      If read on a microplate reader, the OD at 450 or 450/620 nm must be $\geq$0.500.
   b) Negative Control must be visually clear.
      If read on a microplate reader, the OD at 450 nm must be <0.120.
      If read at 450/620 nm the absorbance must be <0.080.
3. Wells that are clear visually but give absorbance >0.120 should be wiped on the underside and re-measured.
4. Visual readings must be taken in good light against a white background.
5. A sample that yields a weak positive result (i.e., <0.200 O.D.) and is adjacent to a strong positive should be re-tested to assure carryover did not occur.

INTERPRETATION OF RESULTS

1. **Visual Reading**
   Negative = Colorless
   Positive = Any yellow color
2. **Spectrophotometric Single Wavelength at 450 nm**
   Negative = OD <0.120
   Positive = OD $\geq$0.120

3. **Spectrophotometric Dual Wavelength at 450/620 nm**
   Negative = OD <0.080
   Positive = OD ≥0.080

A positive test result indicates that *C. difficile* antigen is present in the fecal specimen.
A negative test result indicates that *C. difficile* antigen is not present in the fecal specimen.

LIMITATIONS OF THE *C. DIFF CHEK*™ - *60* TEST

1. The *C. DIFF CHEK*™ - *60* test is used to detect *C. difficile* antigen in fecal specimens. The test confirms the presence of antigen in feces and this information should be taken under consideration by the physician in light of the clinical history of the patient and the results of toxin detecting tests. A positive result with the *C. DIFF CHEK*™ - *60* test DOES NOT confirm the existence of toxigenic strain of *C. difficile*. If a positive result is seen using the *C. DIFF CHEK*™ - *60* test, it is suggested that the *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ test (30397) be used to confirm the presence of toxin. Alternatively, tissue culture cytotoxicity assay may be performed to verify the presence of the toxins.
2. Fecal specimens represent an extremely complex clinical specimen. Optimal results with the *C. DIFF CHEK*™ - *60* test are obtained with specimens that are less than 24 hours old. Most undiluted specimens can be stored between 2° and 8°C for 72 hours before significant degradation of the antigen is noted. If specimens are not assayed within this time period, they maybe frozen and thawed. However, repeated freezing and thawing may result in loss in the immunoreactivity of the antigen.
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 or the presence of binding substances or inactivating enzymes in the feces. *Under these conditions, the specimen should be re-tested or a fresh specimen should be tested.* Additional tests that may be used in conjunction with the *C. DIFF CHEK*™ - *60* test include isolation of the organism on selective media, toxin-specific ELISAs, or tissue culture cytotoxicity assays for the detection of *C. difficile* toxin. The isolation of the organism does not confirm that the organism is toxigenic. Additional testing of the isolate using a toxin-specific ELISA or tissue culture assay must confirm this.
4. Fecal specimens preserved in 10% Formalin, merthiolate formalin, sodium acetate formalin, or polyvinyl alcohol, or in transport media such as Cary Blair, or C&S CANNOT be used.

EXPECTED VALUES

Fecal specimens used in this study were submitted for routine laboratory testing for the presence of *C. difficile* and its toxins. Fecal specimens of all consistencies (solid, semisolid and liquid) were included in these studies. The prevalence of a positive *C. DIFF CHEK*™ - *60* test at three independent study sites was: Site #2 (N=100), 20.0%; Site #3 (N=100), 33.0%; Site #4 (N=275), 14.5%.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical evaluation

The *C. DIFF CHEK*™ - *60* test was compared to the bacterial culture test at three hospitals/reference laboratories and in-house at TECHLAB[â]. Specimens included in the evaluation were submitted to the clinical laboratory for routine testing. The presumptive bacterial culture test was performed according to the in-house procedure (13). The result is shown in Table 1 below.

Table 1. Summary of clinical performance comparing *C. DIFF CHEK™ - 60* test to presumptive bacterial culture.

Summary (n = 642)	Presumptive Bacterial Culture **positive**	Presumptive Bacterial Culture **negative**
C. DIFF CHEK ™ - 60 **positive**	74	47
C. DIFF CHEK ™ - 60 **negative**	31	490

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Sensitivity	70.5%	60.7%	78.8%
Specificity	91.2%	88.5%	93.4%
Negative Predictive Value	94.0%	91.6%	95.9%
Correlation	87.9%	85.9%	89.6%

Discrepant samples were resolved by purification of DNA from fecal specimens and polymerase chain reaction amplification of the *C. difficile* GDH gene. Thirty-eight of the 47 apparent false positive samples were PCR positive for the *C. difficile* GDH gene, and were considered as true positives. Nine remained false positives. Thirty of the 31 apparent false negative specimens were PCR negative for the GDH gene, and were considered true negatives. One remained a false negative. The results are presented in Table 2 below.

Table 2. Summary of clinical performance comparing *C. DIFF CHEK™ - 60* test to resolved bacterial culture.

Summary (n = 642)	Resolved Bacterial Culture **positive**	Resolved Bacterial Culture **negative**
C. DIFF CHEK ™ - 60 **positive**	112	9
C. DIFF CHEK ™ - 60 **negative**	1	520

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Correlation	98.4%	98.2%	98.6%

Centrifugation

A total of 43 fecal specimens were evaluated in the *C. DIFF CHEK™ - 60* test to determine the effect of centrifugation on the test results. For the analysis, specimens were diluted as described in the Package Insert, and the appropriate volume of each specimen was transferred into a microassay well for assay. The remaining diluted specimens were centrifuged (5,000 x g) for 1 minute and an appropriate volume of each supernatant fluid was transferred to a microassay well for assay. The results from the two methods were compared. The results demonstrated a correlation of 100% between noncentrifuged and centrifuged specimens.

SPECIFICITY

Various organisms were examined for cross-reactivity in the *C. DIFF CHEK™ - 60* test. For the analysis, broth cultures mixed with *Diluent* were evaluated. Broth cultures at log phase containing $>10^8$ CFU/mL were used. Organisms that did not react under any of the conditions are listed in Table 3 below. The only organisms that reacted were toxigenic and nontoxigenic *C. difficile*.

Table 3. Organisms that do not react in the *C. DIFF CHEK™ - 60* test

Bacterial and Yeast Isolates		
Aeromonas hydrophila	*Clostridium histolyticum*	*Proteus vulgaris*
Bacillus cereus	*Clostridium novyi*	*Pseudomonas aeruginosa*
Bacillus subtilis	types A, B, and C	*Salmonella typhimurium*
Bacteroides fragilis	*Clostridium perfringens*	*Shigella dysenteriae*
Candida albicans	types A, B, D and E	*Shigella flexneri*
Campylobacter coli	*Clostridium septicum*	*Shigella sonnei*
Campylobacter fetus	*Clostridium sordellii*	*Staphylococcus aureus*
Campylobacter jejuni	*Clostridium sporogenes*	*Staphylococcus epidermidis*
Clostridium bifermentans	*Enterococcus faecalis*	*Staphylococcus saprophyticus*
Clostridium butyricum	*Escherichia coli*	*Veillonella parvula*
Clostridium innocuum	*Klebsiella pneumoniae*	*Vibrio parahaemolyticus*
Clostridium haemolyticum	*Peptostreptococcus anaerobius*	*Yersinia enterocolitica*

Viruses	
Adenovirus types 1, 2, 3, 5, 41, 4D	Echovirus types 9, 11, 18, 22, 33
Human coronavirus 229E	Enterovirus Toluca 1
Coxsackie virus B2, B3, B4, B5	Enterovirus types 70, 71, 68

EFFECT OF FECAL CONSISTENCY

The reaction of fecal samples of varying consistencies in the *C. DIFF CHEK™ - 60* test and in resolved bacterial culture test is shown in Table 4 below. A total of 629 fecal samples of known consistency were included. The percentages of positive reactions using either the antigen test or the bacterial culture 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. The result shows the *C. DIFF CHEK™ - 60* test performed similarly to bacterial culture assay when testing fecals of different consistencies.

Table 4. Reaction of fecals of varying consistencies in the *C. DIFF CHEK™ - 60* test

# of Specimens (n = 629)	Liquid Fecals (n = 256)	Semi-solid Fecals (n = 247)	Solid Fecals (n = 126)
C. DIFF CHEK™ - 60, positive	39 (15.2%)	49 (19.8%)	29 (23.0%)
Resolved Bacterial Culture, positive	41 (16.0%)	49 (19.8%)	25 (19.7%)
C. DIFF CHEK™ - 60, negative	217 (84.8%)	198 (80.2%)	97 (77.0%)
Resolved Bacterial Culture, negative	215 (84.0%)	198 (80.2%)	101 (80.3%)

REPRODUCIBILITY AND PRECISION

Seven positive and five negative fecal specimens were sent to each of three independent laboratories for analysis using the *C. DIFF CHEK™ - 60* test. All specimens were kept frozen at ≤ -10°C until the assay was performed. The results from each laboratory were compared with in-house results and found to be identical. The positive specimens were confirmed to be positive and the negative specimens were confirmed to be negative at each site.

The intra-assay Coefficient of Variation (CV) of the *C. DIFF CHEK™ - 60* test was determined by analyzing 48 positive and 48 negative control reactions along with 8 negative fecal specimens. The positive and negative reactions were tested using 1 or 2 drops of *Positive Control* or *Diluent*. Each fecal specimen was tested in 12 wells. The intra-assay CV was 2.0% to 2.4% with the positive control reactions, 9.3% to 9.4% for the negative control reactions, and 8.7% with the negative fecal specimens. The inter-assay CV was determined using 7 positive and 5 negative fecal specimens tested with three different lots of test kits. The CV ranged from 0.3% to 37.8%, with an average of 8.3%.

C. DIFF CHEK™ - 60 - ESPAÑOL

USO PREVISTO

El test *C. DIFF CHEK™ - 60* es un enzimoinmunoanálisis para su uso como test de cribado en la detección del antígeno de *Clostridium difficile*, la glutamato deshidrogenasa, en muestras fecales de personas de las que se sospecha una enfermedad por *C. difficile*. El test no distingue entre las cepas toxigénicas y las no toxigénicas de *C. difficile*. Con pruebas adicionales que detectan las toxinas de *C. difficile*, este 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 enfermedad está causada por las toxinas que produce 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 únicamente la toxina B (4,5,6,7). 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 (8-11). El antígeno puede detectarse en las muestras fecales con el test *C. DIFF CHEK™ - 60*. Un resultado positivo del test, que es muy específico respecto a la glutamato deshidrogenasa del *C. difficile*, confirma la presencia de este microorganismo en una muestra fecal, mientras que un resultado negativo indica la ausencia de este microorganismo. Si se obtiene un resultado positivo, deberá realizarse un test específico para la toxina para confirmar la presencia de *C. difficile* toxigénico.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El test *C. DIFF CHEK™ - 60* utiliza anticuerpos específicos frente a la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile*. La *Placa para microanálisis* suministrada con este kit contiene anticuerpos policlonales inmovilizados frente al antígeno. El *Conjugado* consiste en un anticuerpo monoclonal altamente específico conjugado con peroxidasa de rábano picante. En el análisis se emulsiona una alícuota de una muestra fecal en el *Diluyente* y la muestra diluida se transfiere al micropocillo que contiene el *Conjugado*. Si el antígeno está presente en la muestra, se unirá al *Conjugado* y al anticuerpo policlonal inmovilizado durante la fase de incubación. El material no unido se elimina durante los pasos de lavado. Tras añadir el *Sustrato* se detecta un color debido a los complejos enzima-anticuerpo-antígeno que se forman en presencia de antígeno.

MATERIALES SUMINISTRADOS

DIL | SPE ***Diluyente* (40 ml)** – Solución proteínica tamponada que contiene conservante*

CONJ | ENZ — ***Conjugado* (7 ml)** – Anticuerpo monoclonal de ratón específico del antígeno unido a peroxidasa de rábano picante, en una solución tamponada proteínica (contiene ProClin® 300 al 0,05%)
Palabra de advertencia: Advertencia
H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501



SUBS | REAG — ***Sustrato* (14 ml)** – Solución que contiene tetrametilbenzidina y peróxido

CONTROL | + — ***Control positivo* (4,5 ml)** – Antígeno en una solución tamponada proteínica que contiene conservante

WASHBUF | 20X — ***Tampón de lavado concentrado* (50 ml)** – Concentrado 20x que contiene suero fisiológico tamponado con fosfato, detergente y tiomersal al 0,2%*
Palabra de advertencia: Advertencia
H373: Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas
P260, P314, P501



H_2SO_4 | 0.6N — ***Solución de parada* (7 ml)** – Ácido sulfúrico 0,6N. ATENCIÓN: Evitar el contacto con la piel; aclarar inmediatamente con agua en caso de contacto.
Palabra de advertencia: Peligro
H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves
P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501



MA | PLT — ***Placa para microanálisis*** – 12 tiras, cada una con 8 pocillos recubiertos con anticuerpo específico frente al antígeno del *C. difficile*

***contiene mercurio** 

IVD — PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

ACCESORIOS

Varillas aplicadoras (50)
Hojas adhesivas de plástico (2)
Pipetas desechables de plástico (100)
Etiqueta de la solución de lavado (1)

OPCIONAL

Dispositivos *FECAL-QUIK PREP*® (96)

MATERIALES Y EQUIPOS REQUERIDOS PERO NO PROPORCIONADOS

Pipeta — *Cronómetro* — *Toallas de papel u hojas absorbentes*
Contenedor de desechos — *Agua destilada* — *Mezclador Vórtex*
Lector de Microplacas (Espectrofotómetro) – capaz de leer a longitud de onda dual a 450/620 nm o longitud de onda única a 450 nm (se recomienda la longitud de onda dual; la absorbancia debe ser leída a 450 nm y la referencia a 620 nm)
Refrigerador – entre 2º y 8ºC
Incubadora - a 37ºC ± 2ºC

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 que contiene los reactivos con el período de validez indicado debe conservarse a una temperatura entre 2 y 8° C y debe devolverse al frigorífico lo antes posible después de su uso.

PRECAUCIONES

1. No deben mezclarse reactivos de kits diferentes. No utilizar los kits después de su fecha de caducidad.
2. Cada componente del kit debe inspeccionarse por si existe algún 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. Los reactivos deben mantenerse a temperatura ambiente antes de su uso.
4. Los tapones y las puntas están codificadas con colores y NO deben mezclarse.
5. Cuando se manipulan los micropocillos debe evitarse rascar el fondo de los pocillos, ya que esto podría provocar lecturas de absorbancia elevadas.
6. Mantener verticalmente los frascos del gotero para garantizar un tamaño de gota adecuado.
7. Manipular las muestras y los micropocillos utilizados como posibles transmisores de agentes infecciosos. Utilizar guantes para realizar el test.
8. El *Concentrado de tampón de lavado 20X* contiene timerosal al 0,2% como conservante. Una vez diluida hasta la concentración de uso normal, esta solución se clasifica como no peligrosa.
9. La *Solución de parada* contiene ácido sulfúrico 0,6N. Aclarar inmediatamente con agua si se produce un contacto.
10. *Los micropocillos no utilizados se introducirán en la bolsa resellable junto con el desecante para protegerlos de la humedad*. Comprobar la bolsa de desecante antes de utilizar los pocillos. El indicador de color de la bolsa de desecante debe estar azul. Si el color pasa a rosa puede verse comprometida la calidad de los pocillos. No utilizar los pocillos almacenados con desecante rosa.
11. No pueden utilizarse muestras conservadas en formol al 10%, formol mertiolato, formol acetato sódico o alcohol polivinílico ni las muestras en medios de transporte como los de Cary Blair o C&S.
12. Efectuar el procedimiento de lavado según las indicaciones para evitar reacciones de fondo elevadas.
13. Para obtener unos resultados óptimos deben analizarse las muestras fecales en un plazo no superior a 72 horas a partir de su recogida. En las muestras congeladas ($\leq$ -10°C) puede reducirse la actividad de la toxina a causa de los procesos de congelación y descongelación.
14. El *Sustrato* es sensible a la luz y debe protegerse de la luz solar directa o de fuentes de UV. El aspecto del reactivo debe ser transparente e incoloro.
15. 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.
16. Se obtienen resultados óptimos siguiendo el procedimiento analítico especificado. Las concentraciones, las condiciones de incubación y las especificaciones de procesamiento están optimizadas para la sensibilidad y la especificidad de la prueba. Las alteraciones del procedimiento especificado o de las condiciones de la prueba pueden afectar a su sensibilidad y especificidad.
17. El reactivo *Conjugado* contiene 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.
18. 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.
19. Siga las normas nacionales, regionales y locales para consultar los reglamentos de eliminación de residuos. No lo tire a la basura, elimínelo como residuo peligroso.

RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS FECALES

NOTA: Los procedimientos internos estándar habituales de recogida y transporte de las muestras fecales se consideran adecuados. Las muestras deben conservarse a una temperatura entre 2° y 8 °C. Siempre que sea posible, las muestras se procesarán en las 24 posteriores a su recogida. Se deben congelar las muestras ($\leq$ -10 °C) si el test no puede realizarse en las 72 horas siguientes a la recogida de la muestra. El congelado y descongelado de la muestra, sobre todo cuando se realiza repetidamente, provoca la pérdida de actividad por la degradación del antígeno. No pueden utilizarse muestras fecales conservadas en formol al 10%, formol mertiolato, formol acetato sódico o alcohol polivinílico ni las muestras en medios de transporte como los de Cary

Blair o C&S. Efectuar el procedimiento de lavado según las indicaciones para evitar reacciones de fondo elevadas. Es preciso asegurarse de que las muestras estén completamente mezcladas (con el vórtex) antes de realizar el análisis. Esto incluye el mezclado completo de la muestra antes de su transferencia al *Diluyente* así como el mezclado completo de la muestra diluida antes de su transferencia al micropocillo. **No** se recomienda conservar las muestras fecales en el *Diluyente*. Realizar el test inmediatamente después de diluir la muestra con el *Diluyente*. Las pipetas desechables incluidas en el kit como accesorios están graduadas a 50, 100, 200 y 300 µl.

1. Asignar un tubo de dilución para cada muestra que se vaya a analizar. Añadir 200 µl de *Diluyente* a cada tubo. *Etiquetar el tubo directamente en el lateral.*
2. En las **muestras fecales sólidas** utilizar una varilla aplicadora para transferir la muestra fecal al tubo. Transferir una cantidad de aproximadamente 3 mm de diámetro con la varilla aplicadora al tubo con *Diluyente*.
   En las **muestras fecales líquidas** utilizar una pipeta de plástico para transferir 50 µl de la muestra al tubo. Comprobar que las muestras líquidas están suspendidas de forma uniforme (mezcladas con vórtex) antes de su transferencia.
3. Mezclar en un vórtex los tubos durante 10 segundos antes de transferir la muestra diluida al pocillo. De esta forma se garantiza que la muestra se ha mezclado bien.
4. Se puede utilizar un equipo de lavado automático o semiautomático para eliminar las partículas restantes en las muestras centrifugadas (5000 x g durante 10 minutos). Duplicar la cantidad de muestra fecal y la cantidad de *Diluyente* para garantizar la presencia de suficiente sobrenadante para los ensayos.

RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS FECALES CUANDO SE UTILIZA EL DISPOSITIVO *FECAL-QUIK-PREP*®

Nota: Este procedimiento debe llevarse a cabo inmediatamente después de obtener la muestra fecal.

1. Sostener el dispositivo *FECAL-QUIK-PREP*® con la varilla roja hacia arriba (en posición vertical). Extraer la torunda de la cánula de plástico.
2. En las **muestras fecales sólidas** cubrir la torunda con una muestra de aproximadamente 3 mm de diámetro. En las **muestras fecales líquidas** introducir la torunda en la muestra y permitir que esta absorba líquido durante 10 segundos como mínimo.
3. Introducir la torunda cubierta de muestra fecal en la cánula de plástico. Asegurarse de que toda la torunda se encuentra en el interior de la cánula. Sostener el dispositivo en posición vertical.
4. Doblar la cámara superior (que contiene el diluyente) partiendo la varilla roja. Presionar el bulbo de la cámara superior para forzar el paso de todo el diluyente hacia la torunda introducida en la cánula.
5. Separar cuidadosamente la torunda de la cánula y, manteniendo aquella en el interior, rotar lentamente la torunda para que se mezcle la muestra fecal con el diluyente.
6. Ajustar de nuevo la torunda a la cánula de plástico.
7. Comprobar que el tapón blanco de la parte inferior del dispositivo se ha ajustado completamente.
8. Apretar y soltar la cámara inferior. Con esta maniobra se hace pasar la muestra diluida a través del filtro. Repetir en caso necesario. Debe valorarse la muestra diluida inmediatamente tras la dilución.

PREPARACIONES PRELIMINARES

1. **IMPORTANTE:** Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de su uso en el análisis.
2. **Preparar *Solución de lavado* 1X.** El *Tampón de lavado concentrado* se suministra como concentrado 20x (se puede apreciar un precipitado). Se debe

diluir hasta un volumen total de 1 litro añadiendo 50 ml del concentrado y 950 ml de agua destilada. Etiquetar el frasco. Conservar la *Solución de lavado* 1x no utilizada a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C.

3. **Preparación de la tira a analizar.** Cada tira contiene 8 pocillos recubiertos de anticuerpos policlonales específicos frente al antígeno del *C. difficile*. Se utilizará uno de estos pocillos recubiertos para cada muestra o control. Determinar el número de pocillos que se va a utilizar. Evitar el contacto con la base de los pocillos. Los pocillos no utilizados deben introducirse de nuevo en la bolsa resellable con desecante y encerrarse de nuevo cuidadosamente en la misma.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

1. Añadir 1 gota (50 µl) de *Conjugado* (tapón rojo) a cada pocillo. Asegurarse de sostener el frasco en posición vertical al añadir las gotas. Utilizar 1 pocillo para cada muestra fecal, 1 pocillo para el control positivo y 1 pocillo para el control negativo. Se pueden realizar marcas de identificación directamente en el lateral del pocillo.

2(a). Transferir 100 µl (2 gotas utilizando una pipeta del kit de accesorios) de muestra diluida al pocillo. Añadir 1 - 2 gotas (50 - 100 µl) del *Control positivo* (tapón negro) al pocillo del control positivo y 1 - 2 gotas (50 -100 µl) del *Diluyente* (control negativo) al pocillo del control negativo. Golpear suavemente para mezclar. **Nota**: Si se utiliza un equipo de lavado semiautomático o automático, se deben centrifugar las muestras (5000 x g durante 10 minutos) para eliminar las partículas.

2(b). **Si utiliza el dispositivo *FECAL-QUIK-PREP*®** - Sostener el dispositivo en posición horizontal y retirar el tapón blanco para que se ventile. Sostener sobre el pocillo de análisis que contiene el conjugado, girar hacia arriba y presionar la cámara inferior para liberar **tres** gotas de muestra diluida en cada pocillo de análisis. Añadir 1 - 2 gotas (50 - 100 µl) del *Control positivo* (tapón negro) al pocillo del control positivo y 1 - 2 gotas (50 -100 µl) del *Diluyente* (control negativo) al pocillo del control negativo.

3. Recortar la hoja adhesiva de plástico al tamaño necesario para cubrir los pocillos. Cubrir los pocillos e incubarlos a 37 °C ± 2 °C durante 50 minutos.
4. Vaciar el contenido de los micropocillos en un contenedor de desechos.
5. Lavar cada pocillo con la *Solución de lavado* 1x en un frasco con rociador con boquilla de punta fina, dirigiendo con fuerza la *Solución de lavado* 1x hacia el fondo del pocillo. Llenar los pocillos y a continuación transferir la *Solución de lavado* de los pocillos a un contenedor de desechos. Golpear la placa invertida sobre una compresa de papel seca.
6. Repetir la etapa 5 **cuatro veces** utilizando cada vez una compresa de papel seca. Si se observan partículas en los pocillos, seguir lavando hasta que se elimine esta materia. **Nota**: Si se utiliza un equipo de lavado semiautomático o automático, añadir 350 µL de *Solución de lavado* 1X a cada pocillo. Lavar un total de **7** veces. Si se observan partículas en el pocillo, seguir lavando hasta que haber eliminado todas estas partículas.
7. Después del lavado, retirar completamente cualquier líquido residual de los pocillos golpeando de nuevo la placa sobre una compresa de papel seca hasta que no salga más líquido. *Eliminar adecuadamente las compresas de papel y los contenedores de muestras.*
8. Añadir 2 gotas (100 µl) de *Sustrato* (tapón azul) a cada pocillo. Golpear suavemente los pocillos para mezclar el sustrato. Incubar los pocillos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Golpear suavemente los pocillos a los 5 minutos.
9. Añadir una gota (50 µl) de *Solución de parada* (tapón amarillo) a cada pocillo. La adición de la *Solución de parada* hace virar el color azul a amarillo, lo que puede cuantificarse determinando la densidad óptica a 450 nm en un lector de microplacas. El instrumento debe calibrarse con aire. Si se utiliza un lector de longitud de onda doble, calibrar con aire a 620 nm y leer a 450 nm. Antes de determinar la densidad óptica, limpiar la parte inferior de cada pocillo para retirar la

humedad. Si no se dispone de un lector de microplacas, la prueba se puede leer visualmente en condiciones de iluminación adecuadas frente a un fondo blanco. Leer entre 2 y 10 minutos después de añadir la *Solución de parada*.

PROCEDIMIENTO OPCIONAL DE ENSAYO/ FORMATO RÁPIDO

Realizar el procedimiento habitual de la prueba siguiendo las instrucciones antes proporcionadas sustituyendo la incubación de 50 minutos a 37 °C ± 2 ° por 20 minutos a 37 °C utilizando el *Incubador/Agitador Stat Fax 2200* o un aparato equivalente. Si se utiliza el *Incubador/Agitador Stat Fax 2200*, seleccionar la velocidad 7 del agitador y fijar la temperatura en 37 °C. Se recomienda una velocidad de 1500 rpm si se utilizan otros agitadores. La agitación no debe producir derramamiento. Si se produce algún derramamiento, debe reducirse la velocidad (12).

CONTROL DE CALIDAD

1. Se efectuarán un control positivo y un control negativo con cada serie de muestras problema.
2. Los controles positivo y negativo deben estar dentro de sus respectivos rangos o la prueba no será válida.
   a) El control positivo debe tener un color amarillo visible.
      Si se lee en un lector de placas de microvaloración, la DO a 450 o 450/620 nm debe ser $\geq$0,500.
   b) El control negativo debe ser transparente.
      Si se lee en un lector de placas de microvaloración, la DO a 450 nm debe ser <0,120.
      Si se lee a 450/620 nm, la absorbancia debe ser <0,080.
3. Si los pocillos parecen transparentes pero tienen una absorbancia >0,120, se debe limpiar la parte inferior de los mismos y después repetir su lectura.
4. Las lecturas visuales se deben realizar en condiciones adecuadas de iluminación frente a un fondo blanco.
5. Para garantizar que no se ha producido ningún efecto de arrastre, debe repetirse el análisis de aquellas muestras que den resultados débilmente positivos (p. ej., DO <0,200) y que estén adyacentes a otro fuertemente positivo.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. **Lectura visual**
   Negativo = Incoloro
   Positivo = Cualquier tonalidad amarilla
2. **Espectrofotómetro con longitud de onda única a 450 nm**
   Negativo = DO <0,120
   Positivo = DO $\geq$0,120
3. **Espectrofotómetro con longitud de onda doble a 450/620 nm**
   Negativo = DO <0,080
   Positivo = DO $\geq$0,080

Un resultado positivo indica que el antígeno del *C. difficile* está presente en la muestra fecal.

Un resultado negativo indica que el antígeno del *C. difficile* no está presente en la muestra fecal.

LIMITACIONES DEL TEST *C. DIFF CHEK™ - 60*

1. El test *C. DIFF CHEK™ - 60* se utiliza para detectar antígenos del *C. difficile* en muestras fecales. El test confirma la presencia de antígeno en las heces y esta información debe tenerla en cuenta el médico junto con la anamnesis del paciente y los resultados de los tests de detección de toxinas. Un resultado positivo en el test *C. DIFF CHEK™ - 60* NO confirma la existencia de una cepa toxigénica de *C. difficile*. Si se obtiene un resultado positivo con el test *C. DIFF CHEK™ - 60*, se sugiere utilizar el test *C. DIFFICILE TOX A/B II™* (30397) para confirmar la

presencia de toxina. Alternativamente, puede emplearse un ensayo de citotoxicidad de cultivo tisular para verificar la presencia de las toxinas.

2. Las muestras fecales son un tipo de muestra clínica extremadamente complejo. Los resultados óptimos en el test *C. DIFF CHEK™ - 60* 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 del antígeno. 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 repetidamente, puede perderse la inmunorreactividad del antígeno.
3. En algunas muestras pueden obtenerse reacciones débilmente positivas. Esto puede deberse a diversos factores como la presencia de niveles bajos de antígeno o a la presencia de sustancias fijadoras o de enzimas inactivadoras en las heces. *En estas condiciones, debe repetirse el análisis de la muestra o debe analizarse una muestra fresca.* Otros tests adicionales que pueden utilizarse junto con el test *C. DIFF CHEK™ - 60* son el aislamiento del microorganismo en medios selectivos, los ELISA específicos de la toxina o los ensayos de citotoxicidad en cultivos tisulares para la detección de toxina *C. difficile*. El aislamiento del microorganismo no confirma que el microorganismo sea toxigénico. Esto debe confirmarse con tests adicionales como los ELISA específicos para toxina o los ensayos de cultivos tisulares.
4. NO PUEDEN utilizarse muestras fecales conservadas en formalina 10%, mertiolato-formalina, acetato sódico-formalina ni alcohol polivinílico, ni las muestras en medios de transporte como los medios de Cary Blair o C&S.

VALORES ESPERADOS

Las muestras fecales utilizadas en este estudio fueron enviadas al laboratorio para realizar pruebas de rutina y detectar la presencia de *C. difficile* y sus toxinas. En estos estudios se incluyeron muestras fecales de todas las consistencias (sólidas, semisólidas y líquidas). La prevalencia de un resultado positivo en el test *C. DIFF CHEK™ - 60* en tres centros de estudio independientes fue: centro 2 (N=100), 20,0%; centro 3 (N=100), 33,0%; centro 4 (N=275), 14,5%.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Evaluación clínica

El test *C. DIFF CHEK™ - 60* se comparó con el test de cultivo bacteriano en tres hospitales/laboratorios de referencia y a nivel interno en TECHLAB®. Las muestras incluidas en la valoración fueron enviadas al laboratorio clínico para los análisis de rutina. El test del cultivo bacteriano presunto se realizó de acuerdo con el procedimiento interno (13). En la Tabla 1 se resumen los resultados.

Tabla 1. Resumen del rendimiento clínico en la comparación del test *C. DIFF CHEK™ - 60* con el presunto cultivo bacteriano.

Resumen (n = 642)	Cultivo bacteriano presunto **positivo**	Cultivo bacteriano presunto **negativo**
C. DIFF CHEK ™ - 60 **positivo**	74	47
C. DIFF CHEK ™ - 60 **negativo**	31	490

	Valor estimado	Intervalo de Confianza del 95%	
		Límite inferior	Límite superior
Sensibilidad	70.5%	60.7%	78.8%
Especificidad	91.2%	88.5%	93.4%
Valor predictivo negativo	94.0%	91.6%	95.9%
Correlación	87.9%	85.9%	89.6%

Las muestras discrepantes se resolvieron mediante la purificación del ADN de las muestras fecales y la amplificación del gen GDH de *C. difficile* con la reacción en cadena de la polimerasa. 38 de las 47 muestras aparentemente falsas positivas dieron resultados positivos en la RCP para el gen GDH de *C. difficile* y se consideraron como verdaderas positivas. Nueve se siguieron considerando como falsas positivas. 30 de las 31 muestras aparentemente falsas negativas dieron negativo en la RCP para el gen GDH y se consideraron como verdaderas negativas. Una muestra se siguió considerando falsa negativa. En la Tabla 2 siguiente se presentan los resultados.

Tabla 2. Resumen del rendimiento clínico en la comparación del test *C. DIFF CHEK™ - 60* con el cultivo bacteriano resuelto.

Resumen (n = 642)	Cultivo bacteriano resuelto **positivo**	Cultivo bacteriano resuelto **negativo**
C. DIFF CHEK ™ - 60 **positivo**	112	9
C. DIFF CHEK ™ - 60 **negativo**	1	520

	Valor estimado	Intervalo de confianza del 95%	
		Límite inferior	Límite superior
Correlación	98.4%	98.2%	98.6%

Centrifugación

Se evaluaron en total 43 muestras fecales con el test *C. DIFF CHEK™ - 60* para determinar el efecto de la centrifugación sobre los resultados de las pruebas. Para el análisis se diluyeron las muestras según se describe en el prospecto y se transfirió el volumen apropiado de cada muestra a un pocillo de microanálisis para su determinación. Las muestras diluidas restantes se centrifugaron (5,000 x g) durante 10 minutos para retirar el material insoluble y el líquido sobrenadante se determinó con el test *C. DIFF CHEK™ - 60*. Se compararon los resultados de los dos métodos. Los resultados mostraron una correlación del 100% entre las muestras centrifugadas y las no centrifugadas.

ESPECIFICIDAD

Se examinó la reactividad cruzada de diferentes microorganismos con el test *C. DIFF CHEK™ - 60*. En el análisis se evaluaron cultivos de caldo mezclados con *Diluyente*. Se utilizaron cultivos de caldo en fase logarítmica que contenían >10^8 ufc/ml. Los microorganismos que no reaccionaron en ninguna de las condiciones se presentan en la Tabla 3 siguiente. Los únicos microorganismos que reaccionaron fueron cepas toxigénicas y no toxigénicas de *C. difficile*.

Tabla 3. Microorganismos que no reaccionan en el test *C. DIFF CHEK™ - 60*

Bacterial and Yeast Isolates		
Aeromonas hydrophila	*Clostridium histolyticum*	*Proteus vulgaris*
Bacillus cereus	*Clostridium novyi* types A, B, and C	*Pseudomonas aeruginosa*
Bacillus subtilis	*Clostridium perfringens* types A, B, D and E	*Salmonella typhimurium*
Bacteroides fragilis	*Clostridium septicum*	*Shigella dysenteriae*
Candida albicans	*Clostridium sordellii*	*Shigella flexneri*
Campylobacter coli	*Clostridium sporogenes*	*Shigella sonnei*
Campylobacter fetus	*Enterococcus faecalis*	*Staphylococcus aureus*
Campylobacter jejuni	*Escherichia coli*	*Staphylococcus epidermidis*
Clostridium bifermentans	*Klebsiella pneumoniae*	*Staphylococcus saprophyticus*
Clostridium butyricum	*Peptostreptococcus anaerobius*	*Veillonella parvula*
Clostridium innocuum		*Vibrio parahaemolyticus*
Clostridium haemolyticum		*Yersinia enterocolitica*

Viruses	
Adenovirus types 1, 2, 3, 5, 41, 4D	Echovirus types 9, 11, 18, 22, 33
Human coronavirus 229E	Enterovirus Toluca 1
Coxsackie virus B2, B3, B4, B5	Enterovirus types 70, 71, 68

EFECTO DE LA CONSISTENCIA DE LA MUESTRA FECAL

En la Tabla 4 se muestra la reacción de muestras fecales de diferentes consistencias en el test *C. DIFF CHEK™ - 60* y en el test de cultivo bacteriano resuelto. Se incluyeron en total 629 muestras fecales de consistencia conocida. Los porcentajes de reacciones positivas en el test de antígeno y en el cultivo bacteriano fueron similares en los tres tipos de muestras fecales (líquidas, semisólidas y sólidas). Todas las muestras se enviaron para el análisis de *C. difficile*. El motivo del envío de las muestras para la realización del test era la anamnesis del paciente y no la consistencia de las heces. Los resultados demuestran que el test *C. DIFF CHEK™ - 60* fue equiparable al cultivo bacteriano en el análisis de las muestras fecales de diferentes consistencias.

Tabla 4. Reacción de muestras fecales de diferentes consistencias en el test *C. DIFF CHEK™ - 60*

N° de muestras (n = 629)	Muestras fecales líquidas (n = 256)	Muestras fecales semisólidas (n = 247)	Muestras fecales sólidas (n = 126)
C. DIFF CHEK™ - 60, positivo	39 (15.2%)	49 (19.8%)	29 (23.0%)
Cultivo bacteriano resuelto, positivo	41 (16.0%)	49 (19.8%)	25 (19.7%)
C. DIFF CHEK™ - 60, negativo	217 (84.8%)	198 (80.2%)	97 (77.0%)
Cultivo bacteriano resuelto, negativo	215 (84.0%)	198 (80.2%)	101 (80.3%)

REPRODUCIBILIDAD Y PRECISIÓN

Se enviaron siete muestras fecales positivas y cinco negativas a cada uno de los tres laboratorios independientes para su análisis con el test *C. DIFF CHEK™ - 60*. Todas las muestras se mantuvieron congeladas a ≤ -10°C hasta la realización de la prueba. Al comparar los resultados de cada laboratorio con los resultados de los análisis internos se comprobó que eran idénticos. Las muestras positivas se confirmaron como positivas y las muestras negativas se confirmaron como negativas en todos los laboratorios.

El coeficiente de variación (CV) intranalítico del test *C. DIFF CHEK™ - 60* se determinó analizando 48 reacciones de control positivo y 48 reacciones de control negativo junto con 8 muestras fecales negativas. Las reacciones positivas y negativas se analizaron utilizando 1 ó 2 gotas de *Control positivo* o *Diluyente*. Cada muestra fecal se analizó en 12 pocillos. El CV intranalítico fue 2,0% - 2,4% en las reacciones de control positivo, 9,3% - 9,4% en las reacciones de control negativo y 8,7% en las muestras fecales negativas. El CV intranalítico se determinó utilizando 7 muestras fecales positivas y 5 negativas analizadas con tres lotes diferentes de kits de prueba. El CV osciló entre 0,3% y 37,8%, con una media de 8,3%.

C. DIFF CHEK™ - 60 - DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der *C. DIFF CHEK™ - 60* ist ein Enzymimmunoassay, der als Screening-Test für den Nachweis von *Clostridium difficile*-Antigens Glutamatdehydrogenase (GLDH) in Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf eine *C. difficile*-Erkrankung dient. Der Test unterscheidet nicht zwischen toxigenen und nicht-toxigenen *C. difficile*-Stämmen. Der Test dient unter Verwendung zusätzlicher Tests für den Nachweis von *C. difficile*-Toxinen 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 toxincodierende Gene, während nicht-toxigene Stämme keine Toxingene enthalten. Die Erkrankung ist auf die Toxine zurückzuführen, die der toxigene Organismus produziert. 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 (4,5,6,7). 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 (811). Das Antigen kann mithilfe des *C. DIFF CHEK™ - 60* Tests in Stuhlproben nachgewiesen werden. Ein positives Testergebnis ist hochspefizisch für die *C. difficile*-GLDH und bestätigt, dass dieser Organismus in einer Stuhlprobe vorhanden ist. Ein negatives Testergebnis zeigt an, dass der Organismus nicht vorhanden ist. Bei einem positiven Ergebnis sollte zusätzlich ein toxinspezifischer Test durchgeführt werden, um das Vorhandensein toxigener *C. difficile*-Stämme zu bestätigen.

TESTPRINZIP

Der *C. DIFF CHEK™ - 60* Test basiert auf *C. difficile*-GLDH-spezifischen Antikörper. Die mit dem Kit mitgelieferte Mikrotiterplatte enthält einen immobilisierten polyklonalen Antikörper gegen das Antigen. Das *Konjugat* besteht aus hochspezifischen monoklonalen Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Bei dem Test wird ein Aliquot einer Stuhlprobe im *Verdünnungspuffer* emulgiert und die verdünnte Probe in die Mikrovertiefung mit dem *Konjugat* übertragen. Ist das Antigen in der Probe vorhanden, so bindet es während der Inkubationsphase an das *Konjugat* und den immobilisierten polyklonalen Antikörper. Nicht gebundenes Material wird während der Waschschritte entfernt. Nach der Zugabe von *Substrat* wird aufgrund der Enzym-Antikörper-Antigen-Komplexe, die sich in Gegenwart von Antigen bilden, eine Färbung nachgewiesen.

PACKUNGSINHALT

DIL	SPE

***Verdünnungspuffer* (40 ml)** – Gepufferte Proteinlösung mit Konservierungsstoff*

CONJ | ENZ — ***Konjugat* (7 ml)** - Antigen-spezifischer monoklonaler Antikörper aus der Maus, gebunden an Meerrettich-Peroxidase, in einer gepufferten Proteinlösung
(enthält 0,05% ProClin® 300)



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

SUBS | REAG — ***Substrat* (14 ml)** - Lösung aus Tetramethylbenzidin und Peroxid

CONTROL | + — ***Positive Kontrolle* (4,5 ml)** – Antigen in gepufferter Proteinlösung mit Konservierungsstoff

WASHBUF | 20X — ***Waschpuffer-Konzentrat* (50 ml)** - 20x-Konzentrat mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung, Detergens und 0,2 % Thimerosal*
Signalwort: Warnung



H373: Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition
P260, P314, P501

H_2SO_4 | 0.6N — ***Stopplösung* (7 ml)** – 0,6 N Schwefelsäure. VORSICHT: Kontakt mit der Haut vermeiden; im Falle eines Hautkontakts sofort mit Wasser abspülen
Signalwort: Gefahr



H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501

MA | PLT — ***Mikrotiterplatte*** - 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, die mit Antikörper gegen *C. difficile*-Antigen beschichtet sind

*enthält Quecksilber (Hg)



IVD — FÜR DIE *IN-VITRO*-DIAGNOSE

ZUBEHÖR

Applikatorstäbchen (50)
Einweg-Kunststoffpipetten (100)
Kunststoff-Klebebögen (2)
Waschlösungsetikett (1)

OPTIONAL

FECAL-QUIK PREP ® (96 Stück)

BENÖTIGTES, NICHT ENTHALTENES MATERIAL

Waschflasche *Zeitmesser* *Papiertücher bzw. Saugpapier*
Abfallbehälter *Destilliertes Wasser* *Vortex-Schüttler*
Mikrotiterplatten-Lesegerät (Spektrophotometer) - für zwei Wellenlängen bei 450/620 nm oder eine Wellenlänge bei 450 nm (Plattenlesegerät für zwei Wellenlängen wird empfohlen; Absorptionen sollten bei 450 nm gemessen und bei 620 nm referenziert werden)
Kühlschrank - zwischen 2 °C und 8 °C eingestellt
Inkubator - auf 37 °C ± 2 °C eingestellt

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum des Testkits ist auf dem Packungsetikett angegeben. Das Verfallsdatum für die einzelnen Bestandteile ist auf den jeweiligen Etiketten angegeben. Das Kit mit den Reagenzien von bestimmter Haltbarkeit muss zwischen 2 °C und 8 °C gelagert und nach dem Gebrauch so schnell wie möglich wieder in den Kühlschrank gestellt werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN

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

2. Alle Bestandteile des Kits müssen auf Anzeichen von Undichtigkeit untersucht werden. Bei Erhalt des Kits muss sichergestellt werden, dass die Komponenten nicht wegen unsachgemäßer Transportbedingungen gefroren oder zu warm sind.
3. Die Reagenzien müssen vor dem Gebrauch Raumtemperatur annehmen.
4. Verschlüsse und Spitzen sind farbkodiert; NICHT vertauschen!
5. Vermeiden Sie beim Umgang mit den Mikrovertiefungen, diese zu verkratzen, da dies zu erhöhten Absorptionsmesswerten führen kann.
6. Halten Sie die Tropfflaschen senkrecht, um die richtige Tropfengröße sicherzustellen.
7. Behandeln Sie die Proben und gebrauchten Mikrovertiefungen als infektiöses Material. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Schutzhandschuhe.
8. Das *20-fache Waschpufferkonzentrat* enthält 0,2 % Thimerosal als Konservierungsmittel. Sobald sie auf normale Gebrauchskonzentration verdünnt ist, wird diese Lösung als ungefährlich eingestuft.
9. Die *Stopplösung* enthält 0,6 N Schwefelsäure. Bei Kontakt sofort mit Wasser abspülen.
10. *Nicht verwendete Vertiefungen der Mikrotiterplatte müssen mit Trockenmittel zurück in den wiederverschließbaren Beutel gegeben werden, damit sie vor Feuchtigkeit geschützt sind*. Überprüfen Sie die Trockenmittelpackung vor dem Gebrauch der Mikrovertiefungen. Der Farbindikator auf der Trockenmittelpackung muss blau sein. Ein rosafarbener Indikator bedeutet, dass die Qualität der Mikrovertiefungen nicht gewährleistet ist. Verwenden Sie bitte keine Mikrovertiefungen bei rosafarbenem Trockenmittel.
11. Proben, die in 10 % Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol konserviert wurden, oder Proben aus Transportmedien wie Cary Blair oder C&S dürfen nicht verwendet werden.
12. Führen Sie das Waschverfahren nach Anweisung durch, um starke Hintergrundreaktionen zu vermeiden.
13. Verwenden Sie Stuhlproben nach der Entnahme innerhalb von 72 Stunden, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Gefrorene Proben (≤ -10 °C) können aufgrund des Einfrier- und Auftauvorganges an Aktivität verlieren.
14. Das *Substrat* ist lichtempfindlich und muss vor direktem Sonnenlicht und UV-Quellen geschützt werden. Das Reagens muss klar und farblos sein.
15. Die *positive Kontrolle* dient zur Überprüfung der Reaktivität der anderen Testreagenzien und ist nicht zur Bestätigung der Verlässlichkeit beim Cut-off bestimmt.
16. Optimale Ergebnisse werden erzielt, wenn das angegebene Testverfahren befolgt wird. Die Konzentrationen, Inkubationsbedingungen und Verfahrensdetails wurden in Bezug auf Sensitivität und Spezifität optimiert. Abweichungen vom angegebenen Verfahren und/oder Änderungen der Testbedingungen können die Sensitivität und Spezifität des Tests beeinflussen.
17. Das *Konjugat*-Reagenz enthält 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.
18. 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.
19. Befolgen Sie Ihre nationalen, regionalen und lokalen Verordnungen in Bezug auf die Abfallentsorgung. Nicht zum Hausmüll geben, als gefährlichen Abfall entsorgen.

ENTNAHME UND HANDHABUNG DER STUHLPROBEN

BITTE BEACHTEN: Die üblichen Methoden zur Entnahme und Handhabung von Stuhlproben sind geeignet. Die Proben müssen bei Temperaturen zwischen 2 °C und 8 °C gelagert werden. Nach Möglichkeit sollten die Stuhlproben beim Test weniger als 24 Stunden alt sein. Frieren Sie die Proben ein (≤ -10°C), wenn der Test nicht innerhalb

von 72 Stunden nach der Entnahme durchgeführt werden kann. Das Einfrieren und Auftauen der Proben, v.a. wenn es mehrfach erfolgt, führt zu einem Aktivitätsverlust durch den Zerfall des Antigens. Stuhlproben, die in 10 % Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol konserviert wurden, oder Proben aus Transportmedien wie Cary Blair oder C&S dürfen nicht verwendet werden. Führen Sie das Waschverfahren nach Anweisung durch, um starke Hintergrundreaktionen zu vermeiden. Stellen Sie sicher, dass die Proben vor der Testdurchführung gründlich gemischt werden (Vortexen). Achten Sie auf eine vollständige Mischung der Probe vor der Übertragung in den *Verdünnungspuffer* wie auch der verdünnten Probe vor der Übertragung in die Mikrovertiefung. Stuhlproben sollten **nicht** im *Verdünnungspuffer* gelagert werden. Nach Verdünnung der Probe im *Verdünnungspuffer* muss der Test sofort durchgeführt werden. Die mitgelieferten Einweg-Pipetten sind auf 50, 100, 200 und 300 µl geeicht.

1. Bereiten Sie für jede zu testende Probe ein Verdünnungsröhrchen vor. Geben Sie 200 µl *Verdünnungspuffer* in jedes Röhrchen. *Beschriften Sie das Röhrchen direkt auf der Seite*.
2. Übertragen Sie **feste Stuhlproben** mithilfe eines Applikatorstäbchens in das Reagenzröhrchen. Übertragen Sie eine Menge mit einem Durchmesser von ca. 3 mm mit dem Applikatorstäbchen in den *Verdünnungspuffer.*
   Bei **flüssigen Stuhlproben** übertragen Sie 50 µL Probe mithilfe einer Kunststoffpipette in das Reagenzröhrchen. Stellen Sie sicher, dass die flüssigen Proben vor dem Übertragen gleichmäßig suspendiert werden (Vortexen).
3. Vortexen Sie die Röhrchen 10 Sekunden lang, bevor Sie die verdünnte Probe in die Mikrotiterplattenvertiefung übertragen. So wird eine gründliche Durchmischung der Probe gewährleistet.
4. Bei Proben, die zur Entfernung von Partikeln zentrifugiert wurden (5000 x g – 10 Minuten), können automatische bzw. halbautomatische Waschgeräte verwendet werden. Verdoppeln Sie die Stuhlprobenmenge und Menge des *Verdünnungspuffers*, um einen ausreichenden Überstand für das Testverfahren sicherzustellen.

ENTNAHME UND HANDHABUNG VON STUHLPROBEN MIT DEM *FECAL-QUIK-PREP*® ZUBEHÖRTEIL

Hinweis: Dieses Verfahren muss sofort nach Entnahme der Stuhlprobe durchgeführt werden.

1. Halten Sie den *FECAL-QUIK-PREP*® mit dem roten Stäbchen aufrecht (vertikal). Entfernen Sie den Tupfer aus der Kunststoffhülse.
2. Bei **festen Stuhlproben** bedecken Sie den Tupfer mit einer Probenmenge mit einem Durchmesser von ca. 3 mm. Bei **flüssigen Stuhlproben** halten Sie den Tupfer in die Probe und lassen ihn für mindestens 10 Minuten aufnehmen.
3. Führen Sie den mit der Stuhlprobe bedeckten Tupfer in die Kunststoffhülse ein. Stellen Sie sicher, dass sich der Tupfer vollständig in der Hülse befindet. Halten Sie den *FECAL-QUIK-PREP*® senkrecht.
4. Biegen Sie die obere Kammer mit dem Verdünnungspuffer ab, indem Sie das rote Stäbchen abknicken. Pressen Sie den Kolben der oberen Kammer zusammen, um den gesamten Verdünnungspuffer auf den Tupfer in der Hülse auslaufen zu lassen.
5. Lockern Sie den Tupfer vorsichtig von der Hülse, und drehen Sie den Tupfer sanft in kreisenden Bewegungen in der Hülse herum, um die Stuhlprobe und den Verdünnungspuffer zu vermischen.
6. Ziehen Sie den Tupfer wieder fest in die Kunststoffhülse zurück.
7. Stellen Sie sicher, dass die weiße Verschlusskappe auf der Unterseite fest sitzt.
8. Drücken Sie die untere Kammer zusammen und lassen Sie los. So wandert die verdünnte Probe durch den Filter. Bei Bedarf wiederholen. Die verdünnte Probe muss sofort nach der Verdünnung getestet werden.

VORBEREITUNGEN

1. **WICHTIG:** Vor der Verwendung müssen alle Reagenzien Raumtemperatur angenommen haben.
2. **Bereiten Sie 1x *Waschlösung* zu.** Das *Waschpuffer-Konzentrat* wird als 20x-Konzentrat geliefert (möglicherweise ist ein Präzipitat sichtbar). Verdünnen Sie es auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter, indem Sie 50 ml Konzentrat 950 ml destilliertem Wasser hinzufügen. Beschriften Sie die Flasche. Lagern Sie nicht gebrauchte 1x *Waschlösung* zwischen 2 °C und 8 °C.
3. **Vorbereitung der Teststreifen.** Jeder Streifen enthält 8 Vertiefungen, die mit polyklonalen Antikörpern gegen *C. difficile*-Antigen beschichtet sind. Für jede Probe bzw. Kontrolle ist eine dieser beschichteten Vertiefungen erforderlich. Legen Sie die Anzahl der zu verwendenden Vertiefungen fest. Vermeiden Sie eine Berührung des Bodens der Vertiefungen. Ungebrauchte Mikrovertiefungen müssen zurück in den wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel gegeben und gut verschlossen werden.

TESTVERFAHREN

1. Geben Sie einen Tropfen (50 µl) *Konjugat* (roter Verschluss) in jede Vertiefung. Achten Sie darauf, jede Flasche dabei senkrecht zu halten. Verwenden Sie 1 Vertiefung je Stuhlprobe, 1 Vertiefung für die positive Kontrolle und 1 Vertiefung für die negative Kontrolle. Die Vertiefungen können zur Identifizierung direkt auf der Seite beschriftet werden.

2(a). Übertragen Sie 100 µl (2 Tropfen mithilfe einer Transferpipette aus dem Zubehörset) der verdünnten Stuhlprobe in die Vertiefung. Geben Sie 1 bis 2 Tropfen (50 bis 100 µl) der *positiven Kontrolle* (schwarzer Verschluss) in die für die positive Kontrolle vorgesehene Vertiefung sowie 1 bis 2 Tropfen (50 bis 100 µl) *Verdünnungspuffer* (negative Kontrolle) in die für die negative Kontrolle vorgesehene Vertiefung. Klopfen Sie zum Mischen sanft gegen die Vertiefungen. **Hinweis**: Bei Verwendung halbautomatischer oder automatischer Waschgeräte müssen die Proben zur Entfernung von Partikeln zentrifugiert werden (5000 x g – 10 Minuten).

2(b). **Bei Verwendung eines *FECAL-QUIK-PREP*®** -Halten Sie den *FECAL-QUIK-PREP*® waagerecht und entfernen Sie die weiße Verschlusskappe zur Entlüftung. Halten Sie ihn über die Vertiefung mit dem Konjugat, bringen Sie ihn in senkrechte Position und pressen Sie **drei** Tropfen verdünnte Probe aus der unteren Kammer in jede Vertiefung. Geben Sie 1 bis 2 Tropfen (50 bis 100 µl) der *positiven Kontrolle* (schwarzer Verschluss) in die für die positive Kontrolle vorgesehene Vertiefung sowie 1 bis 2 Tropfen (50 bis 100 µl) *Verdünnungspuffer* (negative Kontrolle) in die für die negative Kontrolle vorgesehene Vertiefung.

3. Schneiden Sie den Kunststoffklebebogen so zurecht, dass er die Vertiefungen abdeckt. Decken Sie die Vertiefungen ab und inkubieren Sie sie bei 37 °C ± 2 °C für 50 Minuten.
4. Schütteln Sie den Inhalt der Mikrovertiefungen in eine Abfallschale aus.
5. Waschen Sie jede Vertiefung mit der 1x *Waschlösung aus* einer Spritzflasche mit feiner Düse, indem Sie die *Waschlösung* jeweils kraftvoll auf den Boden der Vertiefung richten. Füllen Sie die Vertiefungen und schütteln Sie die *Waschlösung* aus der Vertiefung in eine Abfallschale aus. Schlagen Sie die umgedrehte Platte gegen ein trockenes Papiertuch.
6. Wiederholen Sie Schritt 5 **viermal** und verwenden Sie dabei jedesmal ein trockenes Papiertuch. Wenn in den Vertiefungen Partikel sichtbar sind, fahren Sie mit dem Waschen fort, bis alle Partikel beseitigt sind. **Hinweis**: Bei Verwendung eines halbautomatischen bzw. automatischen Waschgeräts geben Sie 350 µl 1x *Waschlösung* in jede Vertiefung. Insgesamt **7** x waschen. Wenn in der Vertiefung Partikel sichtbar sind, fahren Sie mit dem Waschen fort, bis alle Partikel entfernt sind.
7. Entfernen Sie nach dem Waschen sämtliche Flüssigkeitsreste aus den Vertiefungen, indem Sie die Platte nochmals gegen ein trockenes Papiertuch ausschlagen, bis keine

Flüssigkeit mehr austritt. *Entsorgen Sie die Papiertücher und Probengefäße ordnungsgemäß.*

8. Geben Sie 2 Tropfen (100 µl) *Substrat* (blauer Verschluss) in jede Vertiefung. Klopfen Sie zum Mischen des Substrats sanft gegen die Vertiefungen. Inkubieren Sie die Vertiefungen 10 Minuten lang bei Zimmertemperatur. Klopfen Sie nach 5 Minuten sanft gegen die Vertiefungen.
9. Geben Sie 1 Tropfen (50 µl) *Stopplösung* (gelber Verschluss) in jede Vertiefung. Durch Zugabe der *Stopplösung* wandelt sich die blaue Färbung in eine gelbe Färbung um. Dieser Effekt kann quantifiziert werden, indem die optische Dichte bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen wird. Für das Instrument muss der Leerwert gegen Luft ermittelt werden. Wenn Sie ein Lesegerät für zwei Wellenlängen benutzen, messen Sie den Leerwert bei 620 nm und lesen bei 450 nm ab. Wischen Sie vor der Messung der optischen Dichte die Unterseite jeder Vertiefung ab. Sollte kein Mikrotiterplatten-Lesegerät verfügbar sein, so kann das Testergebnis bei guten Lichtverhältnissen gegen einen weißen Hintergrund visuell abgelesen werden. Lesen Sie innerhalb von zwei bis zehn Minuten nach Zugabe der *Stopplösung* ab.

OPTIONALES TESTVERFAHREN/SCHNELLTEST

Führen Sie das reguläre Testverfahren gemäß o. g. Anleitung durch und ersetzen Sie dabei die Inkubationszeit von 50 Minuten bei 37 °C ± 2 °C durch 20 Minuten bei 37 °C. Verwenden Sie dabei den *Stat Fax 2200 Inkubator/Schüttler* oder einen gleichwertigen Inkubator/Schüttler. Bei Verwendung des *Stat Fax 2200 Inkubators/Schüttlers* stellen Sie den Schüttler auf die Geschwindigkeitsstufe 7 und die Temperatur auf 37 °C. Bei Verwendung eines anderen Schüttlers wird eine Geschwindigkeit von 1500 Umdrehungen pro Minute (UpM) empfohlen. Beim Schüttelvorgang darf nichts verschüttet werden. Andernfalls Geschwindigkeit entsprechend reduzieren (12).

QUALITÄTSKONTROLLE

1. Bei jeder Testprobenserie müssen eine positive und negative Kontrolle mitgetestet werden.
2. Die positive und negative Kontrolle müssen in ihrem jeweiligen Bereich liegen, andernfalls ist der Test ungültig.
   a) Die positive Kontrolle muss eine sichtbare gelbe Färbung aufweisen. Wenn mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät abgelesen wird, muss die optische Dichte bei 450 bzw. 450/620 nm $\geq$0,500 sein.
   b) Die negative Kontrolle muss optisch farblos sein. Wenn mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät abgelesen wird, muss die optische Dichte bei 450 < 0,120 sein. Wenn bei 450/620 abgelesen wird, muss die Absorption < 0,080 sein.
3. Vertiefungen, die optisch farblos sind, jedoch eine Absorption >0,120 liefern, müssen auf der Unterseite abgewischt und nochmals gemessen werden.
4. Visuelles Ablesen muss bei gutem Licht gegen einen weißen Hintergrund durchgeführt werden.
5. Wenn eine Probe, die neben einer stark positiven liegt, ein schwach positives Ergebnis (d. h. OD < 0,200) liefert, so muss diese erneut getestet werden, um eine mögliche Verschleppung ausschließen zu können.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

1. **Visueller Messwert**
   Negativ = Farblos
   Positiv = gelbe Färbung
2. **Spektrophotometrie bei einer Wellenlänge von 450 nm**
   Negativ = OD< 0,120
   Positiv = OD $\geq$0,120

3. **Spektrophotometrie bei zwei Wellenlängen von 450/620 nm**
   Negativ = OD< 0,080
   Positiv = OD ≥0,080

Ein positives Testergebnis weist darauf hin, dass *C. difficile*-Antigen in der Stuhlprobe vorhanden ist.
Ein negatives Testergebnis weist darauf hin, dass kein *C. difficile*-Antigen in der Stuhlprobe vorhanden ist.

GRENZEN DES *C. DIFF CHEK™ - 60* TESTS

1. Der *C. DIFF CHEK™ -60* Test dient zum Nachweis von *C. difficile*-Antigen in Stuhlproben. Der Test bestätigt das Vorhandensein von Antigen im Stuhl. Diese Information muss vom Arzt unter Berücksichtigung der Patientenanamnese und der Ergebnisse aus Tests für den Nachweis von Toxin interpretiert werden. Ein positives Ergebnis des *C. DIFF CHEK™ - 60* Tests BESTÄTIGT NICHT das Vorhandensein eines toxigenen *C. difficile*-Stamms. Sollte mit dem *C. DIFF CHEK™ - 60* Test ein positives Ergebnis erzielt werden, so wird empfohlen, den *C. DIFFICILE TOX A/B II™* Test (30397) zur Bestätigung des Vorhandenseins von Toxin durchzuführen. Alternativ kann auch ein Gewebekultur-Zytotoxizitätstest zum Nachweis der Toxine durchgeführt werden.
2. Stuhlproben sind überaus komplex. Optimale Ergebnisse werden beim *C. DIFF CHEK™ - 60* 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 Verfall des Antigens beobachtet wird. Wenn die Proben nicht innerhalb dieses Zeitraums getestet werden, können sie eingefroren und später wieder aufgetaut werden. Einfrieren und Auftauen kann allerdings zu verminderter Immunreaktivität des Antigens führen.
3. Einige Proben können schwach reagieren. Dies kann auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden, wie etwa geringe Antigenkonzentration oder bindende Substanzen bzw. inaktivierende Enzyme im Stuhl. *Unter diesen Bedingungen sollte die Stuhlprobe nochmals getestet oder eine neue Stuhlprobe getestet werden.* Zusätzliche Tests, die zusammen mit dem *C. DIFF CHEK™ - 60* Test durchgeführt werden können, sind Isolierung des Organismus auf selektiven Medien, toxinspezifische ELISA-Tests oder Gewebekultur-Zytotoxizitätstests für den Nachweis von *C. difficile*-Toxin*. Die Isolierung des Organismus allein lässt nicht auf Toxine schließen. Dies muss durch zusätzliches Testen des Isolats mit einem toxinspezifischen ELISA oder Gewebekultur-Test bestätigt werden.*
4. Stuhlproben, die in 10 % Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol konserviert wurden, oder Proben aus Transportmedien wie Cary Blair oder C&S dürfen NICHT verwendet werden.

ERWARTUNGSWERTE

Die in dieser Studie verwendeten Stuhlproben wurde für Routinelabortests auf *C. difficile* und seine Toxine eingesandt. In diesen Studien wurden Stuhlproben jeder Konsistenz (fest, halbfest und flüssig) verwendet. Die Prävalenz eines positiven *C. DIFF CHEK™ - 60* Tests an drei unabhängigen Studienstandorten sah folgendermaßen aus: Standort Nr. 2 (Az=100), 20,0%; Standort Nr. 3 (Az=100), 33,0%; Standort Nr. 4 (Az=275), 14,5%.

LEISTUNGSDATEN

Klinische Beurteilung

Der *C. DIFF CHEK™ - 60* Test wurde mit Bakterienkultur in drei Krankenhäusern/ Referenzlabors sowie intern bei TECHLAB® verglichen. Die dabei untersuchten Proben wurden für Routinetests in das klinische Labor eingesandt. Die präsumtive Bakterienkultur wurde nach dem internen Verfahren durchgeführt (13). Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Zusammenfassung der klinischen Leistung beim Vergleich des *C. DIFF CHEK™ - 60* Tests mit präsumtiver Bakterienkultur.

Zusammenfassung (n = 642)	Präsumptive Bakterienkultur **positiv**	Präsumptive Bakterienkultur **negativ**
C. DIFF CHEK™ - 60 **positiv**	74	47
C. DIFF CHEK™ - 60 **negativ**	31	490

	Schätzwert	95%-Konfidenzintervall	
		Unteregrenze	Oberegrenze
Sensitivität	70,5%	60,7%	78,8%
Spezifität	91,2%	88,5%	93,4%
Negativer Vorhersagewert	94,0%	91,6%	95,9%
Korrelation	87,9%	85,9%	89,6%

Abweichende Proben wurden durch Reinigung der DNA aus Stuhlproben und Amplifikation des *C. difficile*-GLDH-Gens mittels Polymerase-Kettenreaktion geprüft. 38 der 47 scheinbar falsch-positiven Proben lieferten bei der PCR ein positives Ergebnis für das *C. difficile*-GLDH-Gen und wurden als echt positiv betrachtet. 9 blieben falsch-positiv. 30 der 31 scheinbar falsch-negativen Proben lieferten bei der PCR ein negatives Ergebnis für das GLDH-Gen und wurden als echt negativ betrachtet. 1 Probe blieb falsch-negativ. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2. Zusammenfassung der klinischen Leistung beim Vergleich des *C. DIFF CHEK™ - 60* Tests mit geprüfter Bakterienkultur.

Zusammenfassung (n = 642)	Geprüfte Bakterienkultur **positiv**	Geprüfte Bakterienkultur **negativ**
C. DIFF CHEK™ - 60 **positiv**	112	9
C. DIFF CHEK™ - 60 **negativ**	1	520

	Schätzwert	95%-Konfidenzintervall	
		Unteregrenze	Oberegrenze
Korrelation	98,4%	98,2%	98,6%

Zentrifugation

Insgesamt wurden 43 Stuhlproben im *C. DIFF CHEK™ - 60* -Test zur Bestimmung der Zentrifugationswirkung auf die Testergebnisse untersucht. Die Stuhlproben wurden zu diesem Zweck nach den Anweisungen der Packungsbeilage verdünnt und die entsprechende Menge einer jeden Probe in eine Mikrovertiefung übertragen. Die restlichen verdünnten Proben wurden 10 Minuten lang zentrifugiert (5000 x g), um unlösliches Material zu entfernen, und die Überstandsflüssigkeit wurde mit dem *C. DIFF CHEK™ - 60* Test getestet. Die Ergebnisse aus den beiden Verfahren wurden miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigten eine 100%ige Korrelation zwischen nicht zentrifugierten und zentrifugierten Proben.

SPEZIFITÄT

Eine Reihe von Organismen wurde auf Kreuzreaktivität im *C. DIFF CHEK™ - 60* Test untersucht. Für die Analyse wurden mit *Verdünnungspuffer* vermischte Bouillonkulturen evaluiert. Es wurden Bouillonkulturen in der Protokollphase mit $>10^8$ KbE/ml verwendet. Organismen, die unter keinen Bedingungen reagierten, sind in der nachstehenden Tabelle 3 aufgelistet. Die einzigen Organismen, die reagierten, waren toxigene und nicht toxigene *C. difficile*.

TABELLE 3. Organismen, die nicht im *C. DIFF CHEK™ - 60* Test reagieren

Bacterial and Yeast Isolates		
Aeromonas hydrophila	*Clostridium histolyticum*	*Proteus vulgaris*
Bacillus cereus	*Clostridium novyi*	*Pseudomonas aeruginosa*
Bacillus subtilis	types A, B, and C	*Salmonella typhimurium*
Bacteroides fragilis	*Clostridium perfringens*	*Shigella dysenteriae*
Candida albicans	types A, B, D and E	*Shigella flexneri*
Campylobacter coli	*Clostridium septicum*	*Shigella sonnei*
Campylobacter fetus	*Clostridium sordellii*	*Staphylococcus aureus*
Campylobacter jejuni	*Clostridium sporogenes*	*Staphylococcus epidermidis*
Clostridium bifermentans	*Enterococcus faecalis*	*Staphylococcus saprophyticus*
Clostridium butyricum	*Escherichia coli*	*Veillonella parvula*
Clostridium innocuum	*Klebsiella pneumoniae*	*Vibrio parahaemolyticus*
Clostridium haemolyticum	*Peptostreptococcus anaerobius*	*Yersinia enterocolitica*

Viruses	
Adenovirus types 1, 2, 3, 5, 41, 4D	Echovirus types 9, 11, 18, 22, 33
Human coronavirus 229E	Enterovirus Toluca 1
Coxsackie virus B2, B3, B4, B5	Enterovirus types 70, 71, 68

AUSWIRKUNGEN DER STUHLKONSISTENZ

Die Reaktionen von Stuhlproben unterschiedlicher Konsistenz im *C. DIFF CHEK™ - 60* Test und in der aufgelösten Bakterienkultur sind in Tabelle 4 dargestellt. Insgesamt wurden 629 Stuhlproben mit bekannter Konsistenz untersucht. Der Prozentanteil an positiven Reaktionen war bei Verwendung des Antigentests oder der Bakterienkultur 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. Das Ergebnis zeigt, dass der *C. DIFF CHEK™ - 60* Test und die Bakterienkultur beim Testen von Proben mit unterschiedlicher Konsistenz eine ähnliche Leistung erbrachten.

Tabelle 4. Reaktion von Stuhlproben mit unterschiedlicher Konsistenz im *C. DIFF CHEK™ - 60* Test

Anzahl von Proben (n = 629)	Flüssige Proben (n = 256)	Halbfeste Proben (n = 247)	Feste Proben (n = 126)
C. DIFF CHEK™ - 60, positiv	39 (15,2%)	49 (19,8%)	29 (23,0%)
Aufgelöste Bakterienkultur, positiv	41 (16,0%)	49 (19,8%)	25 (19,7%)
C. DIFF CHEK™ - 60, negativ	217 (84,8%)	198 (80,2%)	97 (77,0%)
Aufgelöste Bakterienkultur, negativ	215 (84,0%)	198 (80,2%)	101 (80,3%)

REPRODUZIERBARKEIT UND PRÄZISION

7 positive und 5 negative Stuhlproben wurden jeweils an drei unabhängige Labors zur Analyse mit dem *C. DIFF CHEK™ - 60* Test gesendet. Alle Proben wurden bis zur Durchführung des Tests bei ≤ -10°C eingefroren. Die Ergebnisse der einzelnen Labors wurden mit internen Ergebnissen verglichen und für identisch befunden. An jedem Standort wurden die positiven Proben als positiv und die negativen Proben als negativ bestätigt.

Der Intra-Assay-Variationskoeffizient (VK) für den *C. DIFF CHEK™ - 60* Test wurde durch Analyse von 48 positiven und 48 negativen Kontrollreaktionen gemeinsam mit 8 negativen Stuhlproben bestimmt. Die positiven und negativen Reaktionen wurden anhand von 1 oder 2 Tropfen *positiver Kontrolle* oder *Verdünnungspuffer* getestet. Jede Stuhlprobe wurde in 12 Vertiefungen getestet. Der Intra-Assay-VK betrug 2,0% bis 2,4% bei den positiven Kontrollreaktionen, 9,3% bis 9,4% bei den negativen Kontrollreaktionen und 8,7% bei den negativen Stuhlproben. Der Inter-Assay-VK wurde anhand von 7 positiven und 5 negativen Stuhlproben bestimmt, die mit drei verschiedenen Kitchargen getestet wurden. Der VK lag zwischen 0,3 % und 37,8% mit einem Mittelwert von 8,3 %.

C. DIFF CHEK™ - 60 - FRANCAIS

UTILISATION PRÉVUE

Le test *C. DIFF CHEK™ - 60* est une analyse immunoenzymatique utilisée pour effectuer un test de dépistage de l'antigène de *Clostridium difficile*, glutamate déshydrogénase, dans les selles de personnes suspectées d'être atteintes d'une infection par *C. difficile*.

Le test ne distingue pas les souches de *C. difficile* toxinogènes des souches non-toxinogènes. Associé à des tests complémentaires pour la détection des toxines *C. difficile*, ce test contribue au diagnostic de la maladie *C. difficile*. Ces résultats doivent être évalués, comme pour tous les autres tests *C. difficile*, 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 maladie est le résultat 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 (4,5,6,7). 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 (8-11). L'antigène peut être détecté dans les échantillons de selles via le test *C. DIFF CHEK™ - 60*. Un résultat positif du test, très spécifique au glutamate déshydrogénase de *C. difficile*, confirme la présence de cet organisme dans les selles. Un résultat négatif révèle l'absence de cet organisme. Un résultat positif doit être suivi d'un test spécifique aux toxines afin de confirmer la présence de *C. difficile* toxinogènes.

PRINCIPE DU TEST

Le test *C. DIFF CHEK™ - 60* utilise des anticorps spécifiques à la glutamate déshydrogenase de *C. difficile*. La *Microplaque* fournie dans le kit contient des anticorps polyclonaux immobilisés contre l'antigène. Le *Conjugué* est composé d'anticorps monoclonaux très spécifiques conjugués à de la peroxydase de raifort. Dans l'essai, une aliquote d'un échantillon de selles est émulsifiée dans le *Diluant* et l'échantillon dilué est transféré dans le micropuits contenant le *Conjugué*. Si l'antigène est présent dans l'échantillon, il se liera au *Conjugué* et aux anticorps polyclonaux immobilisés lors de la phase d'incubation. Toute substance non liée est éliminée lors du processus de lavage. L'adjonction du *Substrat* entraîne une modification de la coloration suite à la formation d'un complexe enzyme-anticorps-antigène en présence d'antigène.

MATÉRIEL FOURNI

DIL	SPE

***Diluant* (40 ml)** – Solution tamponnée et protéinée contenant un conservateur*

CONJ | ENZ — ***Conjugué* (7 ml)** - Anticorps monoclonal de souris spécifique de l'antigène, conjugué à de la peroxydase de raifort, dans une solution protéique tamponnée (contient du ProClin® 300 0,05%)



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

SUBS | REAG — ***Substrat* (14 ml)** – Solution contenant du tétramethylbenzidine et du peroxyde

CONTROL | + — ***Contrôle positif* (4,5 ml)** – Antigène dans une solution tamponnée et protéinée contenant un conservateur

WASHBUF | 20X — ***Tampon de lavage concentré* (50 ml)** – Concentré à 20X contenant un tampon salin phosphaté, un détergent et 0,2 % de thimérosal*
Mot indicateur : Avertissement
H373 : Peut endommager les organes en cas d'exposition prolongée ou répétée
P260, P314, P501



H_2SO_4 | 0.6N — ***Solution d'arrêt* (7 ml)** – 0,6 N d'acide sulfurique. ATTENTION : Éviter tout contact avec la peau ; en cas de contact, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau.
Mot indicateur : Danger
H314 : Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires
P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501



MA | PLT — ***Microplaque*** - 12 bandes, 8 micropuits par bande d'enduits d'anticorps spécifiques à l'antigène *C. difficile*

***contient du mercure** 

IVD — POUR UNE UTILISATION DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*

ACCESSOIRES

Écouvillons (50) — Pipettes en plastique jetables (100)
Films adhésifs en plastique (2) — Étiquette de solution de lavage (1)

EN OPTION

Dispositifs *FECAL-QUIK PREP*® (96)

MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Pissette *Minuterie* *Serviettes en papier ou feuilles absorbantes*
Réceptacle à déchets *Eau distillée* *Agitateur vortex*
Un lecteur de microplaques (spectrophotomètre) capable de lire une onde double à 450/620 nm ou une onde simple à 450 nm (un lecteur de plaque à onde double est recommandé ; les absorbances doivent être mesurées à 450 nm et référencées à 620nm).
Réfrigérateur - entre 2° et 8 °C — *Incubateur* - à 37°C ± 2°C

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 contenant les réactifs dont la durée de conservation est indiquée doit être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C et remis au réfrigérateur aussitôt que possible après utilisation.

PRÉCAUTIONS À PRENDRE

1. Les réactifs des différents kits ne doivent pas être mélangés. Ne pas utiliser de kit dont la date d'expiration serait dépassée.

2. Contrôler tous les éléments du kit afin de vérifier qu'ils ne présentent aucun signe de fuite. Examiner le kit dès réception afin de vérifier que les éléments ne sont ni glacés ni chauds au toucher en raison de conditions de transports inadéquates.
3. Les réactifs doivent être à température ambiante avant utilisation.
4. Les capsules et les embouts sont classés par couleur. Il convient de NE PAS les mélanger!
5. Lors des manipulations, éviter d'érafler le fond des micropuits, toute dégradation pouvant entraîner une augmentation des valeurs d'absorbance.
6. Tenir les compte-gouttes en position verticale de façon à dispenser des gouttes de taille adéquate.
7. Manipuler les échantillons et micropuits utilisés comme s'il s'agissait de facteurs de transmission d'agents infectieux. Utiliser des gants pour effectuer les tests.
8. Le *Tampon de lavage concentré 20X* contient du Thimérosal 0,2 % comme conservateur. Une fois diluée à une concentration normale d'utilisation, cette solution est classée comme non dangereuse.
9. La *Solution d'arrêt* contient 0,6 N d'acide sulfurique. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau.
10. *Les micropuits non utilisés doivent être placés dans l'emballage refermable contenant un agent de dessiccation pour les protéger de l'humidité*. Vérifier le paquet de déshydratant avant d'utiliser les micropuits. L'indicateur coloré du paquet de déshydratant doit être bleu. Si la couleur devient rose, la qualité des micropuits peut être compromise. Ne pas utiliser les micropuits conservés avec un déshydratant rose.
11. Les échantillons conservés dans 10 % de formol, de formol thimérosal, de formol d'acétate de sodium ou d'alcool polyvinylique ou les échantillons introduits dans un milieu de transport tel qu'un Cary Blair ou C&S ne peuvent pas être utilisés.
12. Le lavage doit être réalisé suivant les consignes indiquées afin d'éviter toute réaction hors essai.
13. Utiliser les échantillons de selles dans les 72 heures suivant le prélèvement, et ce afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles. Les échantillons congelés (£ -10 °C) peuvent perdre de l'activité suite à la congélation et à la décongélation.
14. Le *Substrat* est photosensible et ne doit pas être directement exposé à la lumière solaire ou à une source de rayons UV. L'aspect du réactif doit être clair et sans odeur.
15. 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.
16. Les meilleurs résultats sont obtenus si la procédure de test spécifiée est respectée. Les concentrations, les conditions d'incubation et les spécifications de traitement ont été optimisées de façon à rendre le test sensible et spécifique. Toute modification de la procédure spécifiée et/ou des conditions de test peut altérer la sensibilité et la spécificité du test.
17. Le *Conjugué* contient 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.
18. 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.
19. Respecter les arrêtés locaux, régionaux et nationaux relatifs aux réglementations sur l'élimination des déchets. Ne pas les jeter avec les déchets ménagers mais avec les matières dangereuses.

PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

REMARQUE : Les procédures standard utilisées sur place pour le prélèvement et la manipulation des échantillons de selles sont appropriées. Les échantillons doivent être

stockés à une température comprise entre 2ºC et 8ºC. Utiliser de préférence des échantillons de moins de 24 heures. Conserver les échantillons à £ -10 °C si le test ne peut être réalisé dans un délai de 72 heures après le prélèvement. La congélation et la décongélation de l'échantillon, en particulier si elles sont répétées, entraînent une perte de l'activité due à la dégradation de l'antigène. Les échantillons de selles conservés dans 10 % de formol, de formol thimérosal, de formol d'acétate de sodium ou d'alcool polyvinylique ou les échantillons introduits dans un milieu de transport tel qu'un Cary Blair ou C&S ne peuvent pas être utilisés. Le lavage doit être réalisé suivant les consignes indiquées afin d'éviter toute réaction hors essai. Veiller à ce que les échantillons soient bien mélangés (mixés) avant de réaliser l'essai. Ceci inclut le mélange complet de l'échantillon avant le transfert dans le *Diluant* ainsi que le mélange complet de l'échantillon dilué avant le transfert dans le micropuits. Le stockage des échantillons de selles dans le *Diluant* n'est **pas** conseillé. Procéder au test dès que l'échantillon de selles a été délayé dans le *Diluant*. Les pipettes jetables fournies avec les accessoires sont graduées de 50, 100, 200 et 300 µL.

1. Préparer un tube de dilution pour chaque échantillon à tester. Ajouter 200 µL de *Diluant* dans chaque tube. *Apposer une étiquette sur le côté de chaque tube*.
2. Pour les **échantillons de selles formés**, utiliser un écouvillon pour transférer l'échantillon de selles dans le tube. Transférer une quantité de 3 mm de diamètre environ avec l'écouvillon dans le *Diluant*.
   Pour les **échantillons de selles liquides**, utiliser une pipette en plastique pour transférer un échantillon de 50 µL dans le tube. Vérifier que les échantillons liquides sont parfaitement suspendus (mixés) avant transfert.
3. Mixer les tubes pendant 10 secondes avant de transférer l'échantillon dilué dans le micropuits. Cette opération garantit un bon mélange de l'échantillon.
4. Un équipement de lavage automatique peut être utilisé avec des échantillons centrifugés (5 000 x g pendant 10 minutes) pour retirer les particules. Doubler la quantité d'échantillon de selles et la quantité de *Diluant* pour garantir un liquide surnageant suffisant pour le test.

COLLECTE ET MANIPULATION D'ÉCHANTILLONS DE SELLES AVEC LE DISPOSITIF *FECAL-QUIK-PREP*® EN OPTION

Remarque : Cette procédure doit être réalisée immédiatement après l'obtention de l'échantillon de selles.

1. Maintenir le dispositif *FECAL-QUIK-PREP*® avec l'écouvillon rouge debout (à la verticale). Retirer la tige de l'enveloppe en plastique.
2. Pour les **échantillons de selles formés**, recouvrir la tige avec un échantillon de 3 mm de diamètre environ. Pour les **échantillons de selles liquides**, placer la tige dans l'échantillon et laisser cette dernière absorber l'échantillon pendant au moins 10 secondes.
3. Insérer la tige recouverte de l'échantillon de selles dans l'enveloppe en plastique. Vérifier que la tige est entièrement insérée dans l'enveloppe. Maintenir le dispositif à la verticale.
4. Replier la chambre supérieure contenant le diluant en faisant claquer l'écouvillon rouge. Pincer le ballon de la chambre supérieure pour envoyer tout le diluant sur la tige dans l'enveloppe.
5. Relâcher doucement la tige dans l'enveloppe et tout en maintenant la tige dans l'enveloppe, faire tourner doucement la tige pour mélanger l'échantillon de selles et le diluant.
6. Resserrer la tige dans l'enveloppe en plastique.
7. Vérifier que le bouchon blanc au bas du dispositif est correctement resserré.
8. Pincer la chambre inférieure puis relâcher. Cela permet de retirer l'échantillon dilué du filtre. Répéter l'opération si nécessaire. L'échantillon dilué peut être immédiatement analysé après sa dilution.

PRÉPARATIONS PRÉLIMINAIRES

1. **IMPORTANT :** Tous les réactifs doivent se trouver à température ambiante avant application dans l'essai.
2. **Préparer la *Solution de lavage* à 1X.** Le *Tampon de lavage concentré* est fourni sous forme de concentré à 20X (un précipité peut être observé). Verser 50 ml de concentré dans 950 ml d'eau distillée pour obtenir un volume total d'un litre. Étiqueter la bouteille. Conserver toute *Solution de lavage* 1X non utilisée à une température comprise entre 2° et 8 °C.
3. **Préparation de la bande d'essai.** Chaque bande contient 8 puits enduits d'anticorps polyclonaux spécifiques à l'antigène *C. difficile*. Chaque échantillon ou solution de contrôle nécessite l'un de ces micropuits enduits. Déterminer le nombre de micropuits à utiliser. Éviter tout contact avec la base des puits. Les micropuits non utilisés doivent être replacés dans l'emballage refermable avec le déshydratant et ce sac doit être fermé hermétiquement.

PROCÉDURE DE TEST

1. Ajouter 1 goutte (50 µL) de *Conjugué* (bouchon rouge) dans chaque micropuits. Veiller à maintenir chaque flacon à la verticale lors de l'ajout des gouttes. Utiliser 1 puits pour chaque échantillon de selles, 1 puits pour le contrôle positif et 1 puits pour le contrôle négatif. Les marques d'identification peuvent être écrites directement sur le côté du micropuits.

2(a). Transférer 100 µL (2 gouttes avec une pipette de transfert du kit d'accessoires) d'échantillon dilué dans le micropuits. Ajouter 1 à 2 gouttes (50 à 100 µL) du *Contrôle positif* (bouchon noir) dans le micropuits de contrôle négatif, 1 à 2 gouttes (50 à 100 µL) du *Diluant* (contrôle négatif) dans le puits de contrôle négatif. Tapoter légèrement pour mélanger.
Remarque: Avec un équipement de lavage semi-automatique ou automatique, les échantillons doivent être centrifugés (5 000 g pendant 10 minutes) pour retirer les particules.

2(b). **Avec un dispositif *FECAL-QUIK-PREP*®** - Maintenir le dispositif à l'horizontale et retirer le bouchon blanc pour l'aération. Remettre le micropuits contenant le conjugué, le tourner vers le haut et pincer la chambre inférieure pour envoyer **trois** gouttes d'échantillon dilué dans chaque micropuits. Ajouter 1 à 2 gouttes (50 à 100 µL) du *Contrôle positif* (bouchon noir) dans le micropuits de contrôle négatif, 1 à 2 gouttes (50 à 100 µL) du *Diluant* (contrôle négatif) dans le puits de contrôle négatif.

3. Couper le film adhésif plastique à la taille nécessaire pour couvrir les puits. Couvrir les puits et les laisser incuber à 37°C ± 2°C pendant 50 minutes.
4. Agiter le contenu hors des micropuits dans un réceptacle à déchets.
5. Nettoyer les micropuits en projetant énergiquement la *Solution de lavage* 1X à l'aide d'un pulvérisateur à jet continu vers le fond de chaque micropuits. Remplir les puits puis agiter la *Solution de lavage* hors du puits dans un réceptacle à déchets. Rabattre la plaque à l'envers sur une serviette en papier sèche.
6. Répéter l'étape 5 **quatre fois** avec une serviette en papier sèche à chaque fois. Si des particules sont visibles dans les micropuits, continuer le lavage jusqu'à disparition complète de ces dernières. **Remarque** : Avec un équipement de lavage semi-automatique ou automatique, ajouter 350 µL de *Solution de lavage* 1X dans chaque micropuits. Laver **7** fois. Si des particules sont visibles dans le micropuits, continuer le lavage jusqu'à disparition complète de ces dernières.
7. Après lavage, éliminer complètement tout liquide résiduel des micropuits en rabattant à nouveau énergiquement la plaque sur une serviette en papier sèche de façon à expulser toute trace de liquide. *Éliminer les serviettes en papier et les récipients ayant contenu des échantillons de façon appropriée.*
8. Verser 2 gouttes (100 µl) de *Substrat* (bouchon bleu) dans chaque micropuits. Tapoter légèrement les micropuits pour mélanger le substrat. Laisser incuber les micropuits à température ambiante pendant 10 minutes. Tapoter doucement les puits au bout de 5 minutes.

9. Verser 1 goutte (50 µl) de *Solution d'arrêt* (bouchon jaune) dans chaque micropuits. Lors de l'adjonction de *Solution d'arrêt*, la couleur bleue vire au jaune. Cette modification peut être quantifiée en mesurant la densité optique à 450 nm sur un lecteur de microplaques. Le zéro d'absorbance de l'instrument doit être ajusté à l'air. Pour les lecteurs à double longueur d'onde, ajuster le zéro à l'air à 620 nm et effectuer la lecture à 450 nm. Essuyer le dessous de chaque micropuits avant de mesurer la densité optique. Si aucun lecteur de microplaques n'est disponible, le test peut être lu à l'œil nu avec un bon éclairage sur fond blanc. Effectuer la lecture entre deux et dix minutes après l'adjonction de la *Solution d'arrêt*.

PROCÉDURE DE TEST EN OPTION/FORMAT RAPIDE

Lancer la procédure de test normale en suivant les instructions fournies ci-dessus, en remplaçant l'incubation de 50 minutes à 37° C ± 2° C par une incubation de 20 minutes à 37° C avec l'*Incubateur/Agitateur Stat Fax 2200* ou tout autre appareil équivalent. Si l'*Incubateur/Agitateur Stat Fax 2200* est utilisé, régler l'agitateur sur la vitesse 7 et la température sur 37º C. Si d'autres agitateurs sont utilisés, une vitesse de 1 500 t/min est recommandée. Toute agitation peut provoquer des renversements. En cas de renversement, réduire la vitesse en conséquence (12).

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

1. Des contrôles positifs et négatifs doivent être effectués sur chaque série d'analyses d'échantillons.
2. Les contrôles positifs et négatifs doivent figurer dans les plages respectives ou le test est invalide.
   a) Le contrôle positif doit être de couleur jaune.
      Lue sur un lecteur de microplaques, la OD à 450 ou 450/620 nm doit être ≥0,500.
   b) Le contrôle négatif doit être visuellement clair.
      Lue sur un lecteur de microplaques, la DO à 450 nm doit être <0,120.
      Lue à 450/620 nm, l'absorbance doit être <0,080.
3. Les micropuits visuellement clairs mais indiquant une absorbance >0,120 doivent être essuyés dessous et remesurés.
4. Les relevés visuels doivent être effectués dans de bonnes conditions d'éclairage sur fond blanc.
5. Un échantillon donnant un résultat positif faible (OD <0,200) et adjacent à un puits positif net doit être renouvelé pour garantir l'absence de contamination.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. **Relevé visuel**
   Négatif = Incolore
   Positif = De couleur jaune
2. **Longueur d'onde spectrophotométrique simple à 450 nm**
   Négative = OD <0,120
   Positive = OD ≥0,120
3. **Longueur d'onde spectrophotométrique double à 450/620 nm**
   Négative = OD <0,080
   Positive = OD ≥0,080

Un résultat positif indique que l'antigène *C. difficile* est présent dans l'échantillon de selles.

Un résultat négatif indique que l'antigène *C. difficile* est présent dans l'échantillon de selles.

LIMITES DU TEST *C. DIFF CHEK™ - 60*

1. Le test *C. DIFF CHEK™ - 60* est utilisé pour détecter l'antigène *C. difficile* dans les échantillons de selles. Ce test confirme la présence d'antigènes dans les selles et ces informations doivent être examinées par le médecin avec le dossier médical du

patient et les résultats des tests de détection de toxines. Un résultat positif au test *C. DIFF CHEK™ - 60* NE CONFIRME PAS l'existence d'une souche de *C. difficile* TOXINOGÈNE. Si un résultat positif est observé avec le test *C. DIFF CHEK™ - 60* il est conseillé de recourir au test *C. DIFFICILE TOX A/B II™* (30397) afin de confirmer la présence de la toxine. Il est aussi possible de réaliser un essai de cytotoxicité par culture cellulaire pour vérifier la présence des toxines.

2. Les échantillons de selles représentent un échantillon clinique extrêmement complexe. Le test *C. DIFF CHEK™ - 60* 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 2ºC et 8ºC pendant 72 heures avant qu'une dégradation significative ne puisse être observée. Si les échantillons ne sont pas testés pendant cette période, ils peuvent être congelés puis décongelés. Toutefois, la congélation et la décongélation peuvent entraîner l'immunoréactivité de l'antigène.
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'antigène, la présence de substances anticorps ou la désactivation des enzymes dans les selles. *Le cas échéant, un nouveau test doit être effectué sur le même échantillon ou sur un échantillon frais.* Des tests supplémentaires peuvent être réalisés en association avec le test *C. DIFF CHEK™ - 60*. Ils comprennent notamment l'isolement de l'organisme dans un milieu sélectif, des tests ELISA spécifiques aux toxines ou des essais de cytotoxicité par culture tissulaire permettant de détecter le *C. difficile* et ses toxines. L'isolement de l'organisme ne permet pas de confirmer que l'organisme est toxinogène. Un test supplémentaire de l'isolat réalisé via la méthode ELISA spécifique à la toxine ou un essai par culture tissulaire permet de le confirmer.
4. Les échantillons de selles conservés dans 10 % de formol, de formol thimérosal, dans du formol d'acétate de sodium ou d'alcool polyvinylique ou les échantillons introduits dans un milieu de transport tel qu'un Cary Blair ou un C&S NE PEUVENT PAS être utilisés.

VALEURS ATTENDUES

Les échantillons de selles utilisés dans cette étude ont été soumis à des tests de routine en laboratoire afin de détecter la présence de *C. difficile* et de ses toxines. Les échantillons de selles de consistances variables (solides, semi-solides et liquides) ont été inclus dans ces études. La prévalence d'un test *C. DIFF CHEK™ - 60* positif dans trois sites d'études indépendants était la suivante : Site nº 2 (N=100), 20,0 %; Site nº 3 (N=100), 33,0 %; Site nº 4 (N=275), 14,5 %.

EFFICACITÉ DU TEST

Évaluation clinique

Le test *C. DIFF CHEK™ - 60* a été comparé à un test de culture bactérienne dans trois établissements/laboratoires de référence et en interne chez TECHLAB®. Les échantillons testés lors de cette évaluation ont été soumis au laboratoire clinique pour des tests de routine. Le test de présomption de culture bactérienne a été réalisé selon les procédures internes de l'établissement (13). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 1 ci-après.

Tableau 1. Résumé des performances cliniques comparant le test *C. DIFF CHEK™ - 60* à la présomption de culture bactérienne.

Résumé (n = 642)	Présomption de culture bactérienne **positive**	Présomption de culture bactérienne **négative**
C. DIFF CHEK™ - 60 **positif**	74	47
C. DIFF CHEK™ - 60 **négatif**	31	490

	Valeur Estimée	Intervalle de confiance de 95 %	
		Limite inférieure	Limite supérieure
Sensibilité	70,5%	60,7%	78,8%
Spécificité	91,2%	88,5%	93,4%
Valeur prédictive négative	94,0%	91,6%	95,9%
Corrélation	87,9%	85,9%	89,6%

Les échantillons contradictoires ont été résolus par purification d'ADN à partir de l'échantillon de selles au moyen de l'amplification en chaîne par polymérase du gène GDH de *C. difficile*. D'après la PCR, trente-huit des 47 échantillons faux positifs apparents étaient positifs pour le gène GDH de *C. difficile* et ont été considérés comme des vrais positifs. Neuf échantillons sont restés faux positifs. Trente des 31 échantillons faux négatifs apparents se sont révélés négatifs d'après la PCR et ont été considérés comme vrais négatifs. Le dernier est resté faux négatif. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Résumé des performances cliniques comparant le test *C. DIFF CHEK™ - 60* à la culture bactérienne résolue.

Résumé (n = 642)	Culture bactérienne positive résolue	Culture bactérienne négative résolue
C. DIFF CHEK™ - 60 **positif**	112	9
C. DIFF CHEK™ - 60 **négatif**	1	520

	Valeur estimée	Intervalle de confiance de 95 %	
		Limite inférieure	Limite supérieure
Corrélation	98,4%	98,2%	98,6%

Centrifugation

Un total de 43 échantillons de selles ont été évalués dans le test *C. DIFF CHEK™ - 60* afin de déterminer l'effet de la centrifugation sur les résultats du test. Pour l'analyse, des échantillons ont été dilués de la façon décrite dans la notice et le volume approprié de chaque échantillon a été transféré dans un micropuits pour y être testé. Les autres échantillons dilués ont été centrifugés (5 000 x g) pendant 10 minutes afin d'éliminer les matières insolubles et le liquide surnageant a été testé dans le test *C. DIFF CHEK™ - 60*. Les résultats des deux méthodes ont été comparés. Les résultats ont montré une corrélation de 100 % entre les échantillons centrifugés et les échantillons non-centrifugés.

SPÉCIFICITÉ

Différents organismes retrouvés dans les intestins ont été examinés afin de déceler une réactivité croisée dans le test *C. DIFF CHEK™ - 60*. L'analyse a porté sur des cultures en milieu liquide mélangées avec le *Diluant*. Les cultures sur milieu liquide utilisées en phase logarithmique contenaient >10^8 CFU/ml. Les organismes n'ayant réagi dans aucune des conditions sont répertoriés dans le Tableau 3 ci-dessous. Les seuls organismes ayant réagi étaient le *C. difficile* toxinogène et le *C. difficile* non-toxinogène.

Tableau 3. Organismes ne réagissant pas dans le test *C. DIFF CHEK™ - 60*

Bacterial and Yeast Isolates		
Aeromonas hydrophila	*Clostridium histolyticum*	*Proteus vulgaris*
Bacillus cereus	*Clostridium novyi*	*Pseudomonas aeruginosa*
Bacillus subtilis	types A, B, and C	*Salmonella typhimurium*
Bacteroides fragilis	*Clostridium perfringens*	*Shigella dysenteriae*
Candida albicans	types A, B, D and E	*Shigella flexneri*
Campylobacter coli	*Clostridium septicum*	*Shigella sonnei*
Campylobacter fetus	*Clostridium sordellii*	*Staphylococcus aureus*
Campylobacter jejuni	*Clostridium sporogenes*	*Staphylococcus epidermidis*
Clostridium bifermentans	*Enterococcus faecalis*	*Staphylococcus saprophyticus*
Clostridium butyricum	*Escherichia coli*	*Veillonella parvula*
Clostridium innocuum	*Klebsiella pneumoniae*	*Vibrio parahaemolyticus*
Clostridium haemolyticum	*Peptostreptococcus anaerobius*	*Yersinia enterocolitica*

Viruses	
Adenovirus types 1, 2, 3, 5, 41, 4D	Echovirus types 9, 11, 18, 22, 33
Human coronavirus 229E	Enterovirus Toluca 1
Coxsackie virus B2, B3, B4, B5	Enterovirus types 70, 71, 68

EFFET DE LA CONSISTANCE DES SELLES

La réaction des échantillons de selles de différentes consistances dans le test *C. DIFF CHEK™ - 60* et dans les cultures bactériennes résolues est présentée dans le Tableau 4 ci-dessous. Un total de 629 échantillons de selles de consistances inconnues ont été inclus. Les pourcentages de réactions positives s'appuyant sur le test antigène ou sur la culture bactérienne étaient similaires pour les trois types d'échantillons de selles (liquides, semi-solides et solides). 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. Les résultats montrent que les performances du test *C. DIFF CHEK™ - 60* sont équivalentes à celles d'un essai en culture bactérienne lorsque les échantillons testés sont de consistances différentes.

Tableau 4. Réaction des selles de consistances variables dans le test *C. DIFF CHEK™ - 60*

Nb d' échantillons (n = 629)	Selles liquides (n = 256)	Selles semi-solides (n = 247)	Selles solides (n = 126)
C. DIFF CHEK™ - 60, positive	39 (15,2%)	49 (19,8%)	29 (23,0%)
Culture bactérienne positive résolue	41 (16,0%)	49 (19,8%)	25 (19,7%)
C. DIFF CHEK™ - 60, négative	217 (84,8%)	198 (80,2%)	97 (77,0%)
Culture bactérienne négative résolue	215 (84,0%)	198 (80,2%)	101 (80,3%)

REPRODUCTIBILITÉ ET PRÉCISION

Sept échantillons de selles positifs et cinq négatifs ont été envoyés aux trois laboratoires indépendants afin d'y être analysés avec le test *C. DIFF CHEK™ - 60*. Tous les échantillons ont été conservés à ≤ -10 °C jusqu'à la réalisation du test. Les résultats de chaque laboratoire ont été comparés aux résultats internes et se sont révélés identiques. Les échantillons positifs ont été confirmés positifs et les échantillons négatifs ont été confirmés négatifs sur chaque site.

Le pourcentage du coefficient de variation (CV) pondéré du test *C. DIFF CHEK™ - 60* a été déterminé en analysant 48 réactions de contrôle positives et 48 réactions de contrôle négatives avec 8 échantillons de selles négatifs. Les réactions positives et négatives ont été testées avec 1 ou 2 gouttes de *Contrôle négatif* ou de *Diluant*. Chaque échantillon de selles a été testé dans 12 micropuits. Le CV intra-essai était de 2,0 % à 2,4 % avec les réactions de contrôle positives, 9,3 % à 9.4 % pour les réactions de contrôle négatives et 8,7 % avec les échantillons de selles négatifs. Le CV intra-essai a été déterminé avec 7 échantillons de selles positifs et 5 négatifs testés avec trois lots différents de kits d'essai. Le CV était compris entre 0,3 et 37,8 %, avec une moyenne de 8,3 %.

REFERENCES

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. D.M. Lyerly, 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. 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.
9. 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.
10. Willis, D. H., and J. A. Kraft. 1992. Confirmation that the latex – reactive protein of *Clostridium difficile* is a glutamate dehydrogenase. J. Clin. Microbiol. **30**:1363-1364.
11. Lyerly, D. M., L. A. Barroso, and T. D. Wilkins. 1991. Identification of the latex test-reactive protein of *Clostridium difficile* as glutamate dehydrogenase. J. Clin. Microbiol. **29**:2639-2642.
12. Data on file.
13. Summanen P., Baron E.J., Citron D.M., Strong C., Wexler H.M., Fingold S.M., *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*, Fifth Edition, 1993, Star publishing company, Belmont, California.

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

The Alere Logo, Alere, and *FECAL-QUIK-PREP* are trademarks of the Alere group of companies.

C. DIFF CHEK, C. DIFFICILE TOX A/B II, the TECHLAB Logo, and TECHLAB are trademarks of TECHLAB, Inc., under license.

Proclin is a trademark of Rohm and Haas Company.

© 2015 TECHLAB®, Inc. All rights reserved.

RMS #92-025-02 **Issued: 05/2015**