C. DIFFICILE TOX-B TEST

A Toxin/Antitoxin Kit for the Detection of
C. difficile Toxin B in Clinical Specimens
Catalog No. T5003 (96 Tests)

ESPANOL p. 8
Kit de toxina/antitoxina para la detección de la toxina B
de *C. difficile* en muestras clínicas
Prod. No. T5003 (96 Pruebas)

DEUTSCH p. 14
Toxin/Antitoxin-Kit für den Nachweis von *C. difficile*-Toxin B
in klinischen Proben
Katalognummer T5003 (96 Tests)

FRANCAISE p. 21
Un kit Toxine/Antitoxine pour la détection de la Toxine B de
C. difficile dans des échantillons de selles
Numéro de Catalogue T5003 (96 Analyses)

Developed and Manufactured by:

TECHLAB®

2001 Kraft Drive
Blacksburg, VA 24060-6358 USA

CE EC REP **Emergo Europe**
Molenstraat 15
2513 BH The Hague
The Netherlands

Distributed by:

Alere™

Alere North America, LLC
30 South Keller Road
Orlando, Florida 32810
TEL 1-877-441-7440
1-321-441-7200 OUTSIDE USA

C. DIFFICILE TOX-B TEST

INTENDED USE

The *C. DIFFICILE TOX-B TEST* is intended for use in conjunction with the tissue culture cytotoxicity assay for the detection of *C. difficile* toxin B in patient specimens. The test is to be used as an aid in the diagnosis of *C. difficile* disease and results should be considered in conjunction with patient history.

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

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 *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. The disease results from the toxins that the 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).

Clostridium 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. Most strains of *Clostridium difficile* either produce both toxins or neither toxin, although recently, toxin A negative/toxin B positive strains have been identified (4-7). Strains that produce high levels of toxin A also produce high levels of toxin B. Likewise, strains that produce low levels of toxin A produce low levels of toxin B, indicating that the toxin production may be similarly regulated. Tests that detect either toxin are being used as diagnostic aids in the identification of toxigenic strains. The genes for the toxins have been cloned and sequenced, and some properties of the toxins are now well-defined (8,9). Both toxins are large (molecular weight of toxin A, 308,000; molecular weight of toxin B, 279,000). Both toxins have a complex series of repeating units at the COOH-terminus of the molecule and these repeating units may serve as the binding portion that recognizes the receptor (10). There is some evidence suggesting that toxins A and B act synergistically and that the initial tissue damage caused by toxin A allows toxin B to exert its toxicity. Therefore, although toxin A is believed to cause most of the clinical signs, toxin B also may play an important role in the disease.

The disease caused by *Clostridium difficile* is complicated by a number of factors. Although the organism is responsible for almost all cases of pseudomembranous colitis, *C. difficile* is estimated to cause only about 25% of the cases of antibiotic-associated diarrhea. Thus, many cases of antibiotic-associated diarrhea are due to other causes. Toxigenic strains of *C. difficile* can range from weakly toxigenic to strains that produce extremely high levels of toxin. It is unclear if mild, self-limiting cases of diarrhea represent only milder forms of the disease caused by infection with weakly toxigenic strains or whether the presence of toxigenic *Clostridium difficile* occurs as a result of the diarrhea.

There are four methods currently used for the detection of *C. difficile* and its toxins in fecal specimens. These include (i) isolation of the organism, (ii) latex agglutination, (iii) tissue culture assay, and (iv) ELISA for detection of toxin A or both toxins A and B. Isolation of the organism and latex agglutination are useful for detecting the presence of the organism in fecal specimens. However, neither test demonstrates the presence of toxin. This has to be done using either the tissue culture test or an ELISA specific for the toxins. The tissue culture procedure has proved to be very useful because of the high activity of *C. difficile* toxin B in the assay. As little as one picogram of the toxin is sufficient to cause a positive reaction. Neutralization of the cytotoxic activity by *C. difficile* antitoxin confirms the presence of *C. difficile* toxin. The assay is to be used as an aid in the diagnosis of *C. difficile* disease and test results must be considered in conjunction with the patient history. This is due to the fact that some adults are asymptomatic carriers and can have detectable levels of toxin in their feces but have no clinical symptoms. In addition, up to 50% of healthy infants can have *C. difficile* toxin in their feces but show no sign of illness.

PRINCIPLE OF THE TEST

The *C. DIFFICILE TOX-B TEST* uses a tissue culture format to detect the presence of cytotoxic activity (noted by cell rounding) in fecal specimens and confirms the identification of *Clostridium difficile* toxin using specific antitoxin. Two reagents are provided in the *C. DIFFICILE TOX-B TEST*. One is the *Positive Toxin Control* reagent. The other is specific antitoxin to be used to confirm the presence of *C. difficile* toxin by neutralizing the cytotoxic activity. Also included is *Diluent* for preparing the fecal specimen. In the assay, an aliquot of a fecal specimen is emulsified in the *Diluent* and the diluted specimen is centrifuged and filtered. A sample of the filtrate is transferred to a tissue culture well containing phosphate-buffered saline (PBS) and to a well containing antitoxin. If *C. difficile* toxin is present, it will cause the cells in the well with PBS to become round, demonstrating the presence of the cytotoxic activity. The presence of *Clostridium difficile* toxin is confirmed if the cytotoxic activity is neutralized in the well containing antitoxin.

MATERIALS PROVIDED

AT — ***Goat Antitoxin against C. difficile***, 3.0 mL (with preservative)

PBS — ***Phosphate-buffered saline* (PBS)**, 3.0 mL (with preservative)

CONTROL + — ***Positive Toxin Control***, 2.0 mL active *C. difficile* toxin in a buffered protein solution containing preservative.

DIL | SPE — ***Diluent***, 100 mL (phosphate-buffered saline containing preservative and phenol red)

T5003 contains sufficient reagents for two 48-Well tissue culture plates.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Microscope for observing cells	Incubator set at 37°C ± 2°C
Centrifuge and centrifuge tubes	Pipettes/pipettor
Test tubes for preparing dilutions	Syringe filters (0.45 to 0.8 µm)

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. Do not use reagents past the expiration date because the sensitivity decreases.

PRECAUTIONS

1. Use fecal specimens within 24 hours of collection to obtain optimal results. Specimens that are frozen (-20°C or lower) may lose activity due to freezing and thawing. AVOID REPEATED CYCLES OF FREEZING AND THAWING THE SPECIMEN. THIS MAY INACTIVATE THE TOXIN.
2. All specimens should be considered as potentially infectious and should be handled appropriately.
3. The *Positive Toxin Control* contains biologically active toxin and should be treated with caution. The antitoxin does not pose any known hazard.
4. Do not use the reagents beyond their expiration dates.
5. Store reagents according to the manufacturer's recommendations. This prolongs the shelf-life of the reagents.
6. Place reagents back in the refrigerator once the procedure has been completed.

COLLECTION AND HANDLING OF FECAL SPECIMENS

Standard collection and handling procedures used in-house for fecal specimens are appropriate. Specimens should be transported as soon as possible and stored between 2° and 8°C. Whenever possible, test fecal specimens which are less than 24 hours old. Store specimens at -20°C, or lower, if the test cannot be performed within 48 hours. **Freezing and thawing of the specimen, especially multiple times, may result in loss of activity due to degradation of the toxin.** Make sure that specimens are thoroughly mixed prior to performing the assay. This includes complete mixing of the specimen prior to preparing the fecal extract.

PROCESSING FECAL SPECIMENS

NOTE: Fecal specimens less than 24 hours old should be tested whenever possible. Specimens should be stored between 2° and 8°C until tested.

1. Set up one tube for each specimen to be tested. Add 1.8 mL *Diluent* to each tube. Label the tube directly on the side.
2. For formed fecal specimens, use a swab to transfer the fecal specimen to the tube. Coat the swab completely before transferring the specimen. Mix the swab in the diluent to remove as much sample as possible and squeeze the swab against the side of the tube to express any residual liquid. For liquid fecal specimens, use a plastic pipette to transfer 0.2 mL specimen to the tube (1/10 dilution). Make sure the liquid specimens are evenly suspended before transferring.
3. Vortex the tubes for 10 seconds. Transfer an aliquot of the specimen to a microcentrifuge tube (e.g., an Eppendorf tube) and centrifuge the specimen for 5 minutes at high speed (2,000 to 10,000 rpms) in a microcentrifuge.
4. Collect the supernatant fluid and filter it through a 0.45 µm membrane into a sterile tube. Store the filtrate between 2° and 8°C.

THE TISSUE CULTURE PROCEDURE

NOTE: The procedure described below may be used to detect *C. difficile* toxin in fecal specimens with the *C. DIFFICILE TOX-B TEST*. Alternatively, the kit may be used according to other modified in-house procedures. It is important, however, that the *Positive Toxin Control* and the antitoxin reagent be used according to the instructions.

1. Determine the number of wells that will be needed to perform the test. Two wells will be needed as control wells each time the test is performed. In addition, two wells will be needed for each specimen. Tissue culture cells that typically are used include human foreskin cells, MRC-5, WI-38, and Chinese Hamster Ovary cells.
2. Add 1 drop (50 µL) of PBS to one of the two wells in each set. Add 1 drop (50 µL) of *C. difficile* antitoxin to the other well in each set. Set up the wells as illustrated in table 1.

Table 1.

Well	PBS or Antitoxin	Test sample
Control Well 1	1 drop (50 µL) PBS	1 drop (50 µL) positive control
Control Well 2	1 drop (50 µL) antitoxin	1 drop (50 µL) positive control
Test Well 1	1 drop (50 µL) PBS	1 drop (50 µL) fecal filtrate
Test Well 2	1 drop (50 µL) antitoxin	1 drop (50 µL) fecal filtrate

The final dilution of fecal filtrate in the well is 1/50. Use new pipette tips between specimens. Please note that (i) one set of controls should be used each time the test is performed and (ii) the remaining fecal filtrate should be refrigerated between 2° and 8°C for up to 48 hours in case additional testing is required.

3. After the samples have been applied, incubate the wells at 37°C ± 2°C for 24 to 48 hours. Observe each well for cell rounding, indicating the presence of cytotoxic activity. The cytotoxic effect is considered positive if at least 50% of the cells in the well are rounded. Record the results for each well. The cytotoxic effect may be observed within 8 hours after applying the specimen if high amounts of toxin are present. However, specimens should not be considered negative until after 48 hours.

QUALITY CONTROL

A positive and negative control must be run with each series of test specimens. This includes the *Positive Toxin Control* added to a well containing buffer to demonstrate

activity, and *Positive Toxin Control* added to a well containing antitoxin to demonstrate neutralization of the cytotoxic activity. The positive control should show the typical rounding effect characteristic of *C. difficile* toxin. The test results are not valid unless these performance characteristics are met. If the performance characteristics are not met, please call Technical Services and do not report test results. Upon arrival, the kit should be inspected to ensure that components arrived in satisfactory condition. Test results along with control results should be recorded and reported according to in-house procedures and this information should be stored according to in-house procedures for future reference.

INTERPRETATION OF RESULTS

Wells containing:		INTERPRETATION OF RESULTS
PBS	*C. difficile* antitoxin	
-	-	Negative - No cytotoxic activity present
+	-	Cytotoxic activity present that is neutralized by *C. difficile* antitoxin, confirming the presence of *C. difficile* toxin in the specimen
+	+	Indeterminate results that may be caused by extremely high levels of *C. difficile* toxin. Fecal filtrate should be diluted an additional 1/10 in *Diluent* and the test should be repeated to rule out this possibility. Upon repeat testing under these conditions, if the cells in the well containing PBS and highly dilute fecal filtrate are rounded and the cells in the well containing antitoxin and highly diluted fecal filtrate are not, *C. difficile* toxin is present. If the cells in both wells are round, the specimen contains cytotoxic activity but it is not due to *C. difficile* toxin.

Control Results: The cells in the well that contains PBS and *Positive Toxin Control* should be round. The cells in the well that contains *C. difficile* antitoxin and *Positive Toxin Control* should appear normal, demonstrating the neutralization of the *Positive Toxin Control* by the antitoxin.

Test Sample Results: When specimen filtrates show evidence of specific *C. difficile* toxin, report "Patient specimen positive for *Clostridium difficile* toxin." When specimen filtrates show no evidence of cytotoxic activity at 48 hours, report "No *Clostridium difficile* toxin detected." When specimen filtrates show evidence of cytotoxic activity that is not neutralized by *C. difficile* antitoxin, report "Nonspecific reaction in patient specimen, not characteristic of *Clostridium difficile* toxin." A repeat specimen may be helpful to rule out patient disease caused by *Clostridium difficile* toxin.

LIMITATIONS OF THE *C. DIFFICILE TOX-B TEST*

1. The *C. DIFFICILE TOX-B TEST* is used to detect *C. difficile* toxin in fecal specimens. Because of the complex nature of feces, specimens should be <24 hours old.
2. Detection of toxin by this test is dependent on the biological activity of the toxin. Specimens must be handled properly and stored as recommended to minimize inactivation of the toxin.
3. Some specimens may give reactions that are inconclusive (e.g., partial rounding of the cells, stretching instead of rounding). Under these conditions, the specimen should be retested or a fresh specimen should be tested. Additional tests that may be used in conjunction with the *C. DIFFICILE TOX-B TEST* include the ELISA for toxin A, ELISA for toxins A and B, isolation of the organism on selective media, and latex agglutination assay for the detection of the organism.

4. Certain isolates of *C. sordellii* produce the same type of rounding on tissue culture cells as toxigenic *C. difficile*. This is due to the similarities of the *C. sordellii* toxins and the *C. difficile* toxins. The strains of *C. sordellii* that produce these related toxins have not been detected in patients with antibiotic-associated diarrhea and colitis.

EXPECTED VALUES

The prevalence of a positive *C. DIFFICILE TOX-B TEST* in our clinical studies ranged from 5.8% to 19%. The prevalence will vary from location to location and hospitals may experience rates lower or higher than those observed at the sites used in the *C. DIFFICILE TOX-B TEST* evaluation. *Clostridium difficile* disease is primarily a nosocomial disease of elderly patients and hospitals that have higher numbers of elderly patients may experience higher rates. It is important to consider any test results in conjunction with clinical symptoms because some healthy adults and large numbers of healthy infants (up to 50%) will be positive for *C. difficile* toxin A or toxin B. In addition, *C. difficile* carriage rates of 22% to 32% have been reported in cystic fibrosis patients (11-13).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The *C. DIFFICILE TOX-B TEST* was evaluated for its performance at four different locations in the United States. For the analysis, the *C. DIFFICILE TOX-B TEST* was compared with another commercial Cytotoxicity Test for *C. difficile* toxins, which also is a tissue culture-based assay. All tissue culture assays were done using human foreskin cells. A summary of the results from the clinical investigations is shown in table 2. The range of overall relative sensitivity, specificity, and correlation for the evaluations is presented in parentheses. In studies performed at reference centers in the northeastern and southeastern U.S. and a medical center on the East Coast involving a total of 427 specimens, the *C. DIFFICILE TOX-B TEST* exhibited an overall relative correlation of 100% with the other commercial test. In a study performed at a medical center in the Mid West involving 517 specimens, the *C. DIFFICILE TOX-B TEST* exhibited an overall relative sensitivity and specificity of 96.7% and 98.5%, respectively. The overall relative correlation was 98.3%. When discrepants were resolved by toxigenic culture, the overall relative sensitivity and specificity increased to 98.3% and 98.7%, with an overall relative correlation of 98.6%.

Table 2

		Commercial Cytotoxicity Assay/Toxigenic Culture	
		positive	negative
TOX-B TEST	positive	114	6
	negative	1	823

Overall relative sensitivity	99.1% (98.3% to 100%)
Overall relative specificity	99.3% (98.7% to 100%)
Overall relative correlation	99.3% (98.6% to 100%)
Number of specimens	944

CROSS-REACTIVITY

Toxic filtrates from *C. chauveoi*, *C. fallax*, *C. perfringens*, *C. septicum*, and *C. spiroforme* were not neutralized by the *C. difficile* antitoxin. In addition, *C. perfringens* alpha-toxin, *C. histolyticum* collagenase and clostripain, cholera toxin, diphtheria toxin, shiga-like toxin, and staphylococcal enterotoxin were not neutralized. The only organism known to cross-react in the *C. DIFFICILE TOX-B TEST* is *C. sordellii*. Certain toxigenic isolates of C. *sordellii* produce toxins that are very similar to the toxins of *C. difficile*. The hemorrhagic toxin (toxin HT) of *C. sordellii* is very similar to toxin A whereas the lethal toxin (toxin LT) is very similar to toxin B. Antibodies against the *C. difficile* toxins neutralize toxins HT and LT of *C. sordellii*. *Clostridium sordellii* has not been implicated in antibiotic-associated diarrhea and colitis.

REPRODUCIBILITY AND PRECISION

Identical sets of six fecal specimens were sent to three different clinical laboratories located in the Mid West, Southeast, and Northeast U.S. The *C. DIFFICILE TOX-B TEST* results from each laboratory were consistent with the results obtained in-house. In an in-house study, five positive fecal specimens were assayed at time 0, 24, 48, and 72 hours using the *C. DIFFICILE TOX-B TEST*. These specimens were shown to be consistently positive for *C. difficile* toxin at each of the time intervals, as determined by neutralization of the cytotoxic activity. The specimens were stored at 4°C during the testing. In additional in-house studies, three different lots of the positive control reagent were tested in duplicate and consistently gave cytotoxic titers of 10^5. Further evaluation demonstrated that different lots of the *C. difficile* antitoxin neutralized the *Positive Toxin Control*.

C. DIFFICILE TOX-B TEST - ESPAÑOL

USO PREVISTO

El análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST* está indicado para su uso junto con el análisis de citotoxicidad de cultivos tisulares para la detección de la toxina B de *C. difficile* en muestras clínicas. La prueba debe utilizarse como ayuda para el diagnóstico de la enfermedad causada por *C. difficile* y los resultados deben evaluarse junto con la historia clínica del paciente.

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

FUNDAMENTO

Después del tratamiento con antibióticos, muchos pacientes sufren problemas gastrointestinales que varían entre diarrea leve y colitis seudomembranosa grave. Una gran parte de los casos más leves de enfermedad gastrointestinal y la mayoría de los casos de colitis seudomembranosa están causados por *Clostridium difficile* (1). Este microorganismo es una bacteria anaerobia oportunista que crece en el intestino cuando la flora normal es alterada por un antibiótico. La enfermedad está causada por las toxinas que produce el microorganismo. 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).

Clostridium difficile también produce una segunda toxina, denominada toxina B. La toxina B, a la que se denomina la citotoxina del microorganismo, se detecta mediante los análisis de cultivos tisulares utilizados actualmente en numerosos laboratorios. La mayoría de las cepas de *Clostridium difficile* produce ambas toxinas o no produce ninguna toxina, aunque recientemente se han identificado cepas que sólo producen la toxina B (4-7). Las cepas que producen niveles altos de toxina A también producen niveles altos de toxina B. Asimismo, las cepas que producen niveles bajos de toxina A producen niveles bajos de toxina B, lo que indica que la regulación de la producción de las toxinas podría ser similar. Se están utilizando pruebas que detectan estas toxinas como ayuda diagnóstica para la identificación de cepas toxígenas. Se han clonado y secuenciado los genes de las toxinas, y actualmente se conocen bien algunas de las propiedades de las toxinas (8,9). Ambas toxinas son grandes (peso molecular de la toxina A, 308,000; peso molecular de la toxina B, 279,000). Ambas toxinas tienen una serie compleja de unidades repetidas en el extremo COOH de la molécula que podrían actuar como fragmento de unión que reconoce el receptor (10). Algunos datos sugieren que las toxinas A y B actúan sinérgicamente y que la lesión tisular inicial causada por la toxina A permite a la toxina B ejercer su toxicidad. Por consiguiente, aunque se cree que la toxina A causa la mayoría de los signos clínicos, la toxina B también podría tener una función importante en la enfermedad.

La enfermedad causada por *Clostridium difficile* se complica por diversos factores. Aunque el microorganismo es responsable de casi todos los casos de colitis seudomembranosa, se calcula que *C. difficile* causa sólo el 25% de los casos de diarrea asociada a antibióticos. Por tanto, muchos casos de diarrea asociada a antibióticos se deben a otras causas. Las cepas toxígenas de *C. difficile* varían desde cepas de baja toxigenicidad a cepas que producen niveles muy altos de toxinas. No se sabe si los casos leves de diarrea de resolución espontánea representan simplemente formas más leves de la enfermedad causada por una infección por cepas de baja toxigenicidad o si la presencia de cepas toxígenas de *Clostridium difficile* es consecuencia de la diarrea.

Actualmente se utilizan cuatro métodos para la detección de *C. difficile* y sus toxinas en muestras fecales: (i) aislamiento del microorganismo, (ii) aglutinación con látex, (iii) análisis de cultivos tisulares y (iv) ELISA para la detección de la toxina A o para la detección de ambas toxinas, A y B. El aislamiento del microorganismo y la aglutinación con látex son útiles para detectar la presencia del microorganismo en muestras fecales. Sin embargo, ninguna de estas pruebas demuestra la presencia de

la toxina. Para demostrar la presencia de la toxina se requiere el uso del análisis de cultivos tisulares o un ELISA específico para las toxinas. La técnica de cultivos tisulares ha demostrado ser muy útil debido a la alta actividad de la toxina B de *C. difficile* en el análisis. Basta un picogramo de la toxina para causar una reacción positiva. La neutralización de la actividad citotóxica por la antitoxina de *C. difficile* confirma la presencia de la toxina de *C. difficile*. El análisis debe utilizarse como ayuda para el diagnóstico de la enfermedad causada por *C. difficile* y los resultados deben evaluarse junto con la historia clínica del paciente. La razón es que algunos adultos son portadores asintomáticos y pueden tener niveles detectables de la toxina en las heces pero no presentar síntomas clínicos. Además, hasta un 50% de los lactantes sanos puede tener la toxina de *C. difficile* en las heces y no mostrar signos de la enfermedad.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST* utiliza un formato de cultivo tisular para detectar la presencia de actividad citotóxica (señalada por el redondeamiento de las células) en muestras fecales y confirma la identificación de la toxina de *Clostridium difficile* utilizando una antitoxina específica. En el análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST* se incluyen dos reactivos. Uno es el reactivo *Control positivo de la toxina*. El otro es la antitoxina específica que se utiliza para confirmar la presencia de la toxina de *C. difficile* mediante la neutralización de la actividad citotóxica. También se incluye un *Diluyente* para la preparación de la muestra fecal. En el análisis, se emulsiona una porción de una muestra fecal en el *Diluyente* y la muestra diluida se centrifuga y filtra. Se transfiere una muestra parcial del filtrado a un pocillo de cultivo tisular que contiene solución salina tamponada con fosfato (PBS) y a un pocillo que contiene la antitoxina. Si la toxina de *C. difficile* está presente, causará el redondeo de las células del pocillo que contiene PBS, lo cual demuestra la presencia de actividad citotóxica. La presencia de la toxina de *Clostridium difficile* se confirma si la actividad citotóxica es neutralizada en el pocillo que contiene la antitoxina.

MATERIALES PROVISTOS

AT — ***Antitoxina de cabra frente a C. difficile***, 3.0 mL (con conservante)

PBS — ***Solución salina tamponada con fosfato* (PBS)**, 3.0 mL (con conservante)

CONTROL + — ***Control positivo de la toxina***, 2.0 mL (toxina activa de *C. difficile* en una solución proteínica tamponada que contiene conservante)

DIL | SPE — ***Diluyente***, 100 mL (solución salina tamponada con fosfato que contiene conservante y rojo fenol)

T5003 contiene reactivos suficiente para dos placas de cultivo tisular de 48 pocillos.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO PROVISTOS

Microscopio para observar las células	Incubadora a 37 °C ± 2 °C
Centrífuga y tubos de centrífuga	Pipetas
Tubos de ensayo para preparar las diluciones	Filtros para jeringuillas (0.45 a 0.8 µm)

PERÍODO DE VALIDEZ Y CONSERVACIÓN

La fecha de caducidad del kit se indica en la etiqueta. Las fechas de caducidad de cada componente se indican en las etiquetas individuales. Los reactivos no deben utilizarse después de la fecha de caducidad debido a que la sensibilidad disminuye.

PRECAUCIONES

1. Las muestras fecales deben analizarse en un plazo no superior a 24 horas desde su recogida para obtener resultados óptimos. En las muestras congeladas (≤ -20 °C) puede perderse la actividad de la toxina por los procesos de congelación y descongelación. DEBEN EVITARSE CICLOS REPETIDOS DE CONGELACIÓN Y

DESCONGELACIÓN DE LA MUESTRA. ESTE PROCESO PODRÍA INACTIVAR LA TOXINA.

2. Todas las muestras deben considerarse potencialmente infecciosas y deben manipularse como tales.
3. El *Control positivo de la toxina* contiene la toxina biológicamente activa y debe tratarse con precaución. La antitoxina no tiene ningún riesgo conocido.
4. Los reactivos no deben utilizarse después de la fecha de caducidad.
5. Los reactivos deben conservarse de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Esto prolongará su período de validez.
6. Los reactivos deben guardarse en el frigorífico una vez finalizado el procedimiento.

RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS FECALES

Los procedimientos internos estándar habituales de recogida y transporte de las muestras fecales son adecuados. Las muestras deben transportarse lo antes posible y conservarse a una temperatura de 2 a 8 °C. Siempre que sea posible, las muestras fecales deben procesarse en las 24 horas posteriores a su recogida. Las muestras deben conservarse a una temperatura igual o inferior a -20 °C si la prueba no puede realizarse en las 48 horas siguientes a la recogida de la muestra. **La congelación y descongelación de la muestra, sobre todo cuando se realiza varias veces, puede provocar la pérdida de actividad por la degradación de la toxina.** Es necesario asegurarse de que las muestras estén completamente mezcladas antes de realizar el análisis. Esto incluye la mezcla completa de la muestra antes de la preparación del extracto fecal.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS FECALES

NOTA: Siempre que sea posible, las muestras fecales deben analizarse en un plazo inferior a 24 horas desde su recogida. Las muestras deben conservarse a una temperatura de 2 a 8 °C hasta su análisis.

1. Asignar un tubo para cada muestra que se vaya a analizar. Añadir 1.8 mL de *Diluyente* a cada tubo. Etiquetar el tubo directamente en el lateral.
2. Para las muestras fecales sólidas, utilizar una torunda para transferir la muestra fecal al tubo. Cubrir totalmente la torunda antes de transferir la muestra. Mezclar la torunda en el diluyente para extraer la mayor cantidad posible de muestra y presionar la torunda contra el lateral del tubo para eliminar el líquido residual. Para las muestras fecales líquidas, utilizar una pipeta de plástico para transferir 0.2 mL de la muestra al tubo (dilución 1/10). Es preciso asegurarse de obtener una suspensión homogénea de las muestras líquidas antes de transferirlas.
3. Agitar los tubos en el vórtex durante 10 segundos. Transferir una porción de la muestra a un tubo de microcentrífuga (por ejemplo, un tubo Eppendorf) y centrifugar la muestra durante 5 minutos a alta velocidad (2,000 a 10,000 rpm) en una microcentrífuga.
4. Recoger el líquido sobrenadante y filtrarlo a través de una membrana de 0.5 µm en un tubo estéril. Conservar el filtrado a una temperatura de 2 a 8 °C.

PROCEDIMIENTO DE CULTIVO TISULAR

NOTA: El procedimiento descrito a continuación puede utilizarse para detectar la toxina de *C. difficile* en muestras fecales con el análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST*. Este kit también puede utilizarse de acuerdo con otros procedimientos internos modificados. No obstante, es importante que el *Control positivo de la toxina* y el reactivo de antitoxina se utilicen de acuerdo con las instrucciones.

1. Determinar el número de pocillos necesarios para realizar el análisis. Se necesitarán dos pocillos como pocillos de control cada vez que se realice el análisis. Además, se necesitarán dos pocillos para cada muestra. Las células de cultivo tisular utilizadas habitualmente son células de prepucio humanas, MRC-5, WI-38 y células ováricas de hámster chino.

2. Añadir 1 gota (50 µL) de PBS a uno de los dos pocillos de cada serie. Añadir 1 gota (50 µL) de antitoxina de *C. difficile* al otro pocillo de cada serie. Preparar los pocillos tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1.

Pocillo	PBS o Antitoxina	Muestra problema
Pocillo de control 1	1 gota (50 µL) de PBS	1 gota (50 µL) de control positivo
Pocillo de control 2	1 gota (50 µL) de antitoxina	1 gota (50 µL) de control positivo
Pocillo de problema 1	1 gota (50 µL) de PBS	1 gota (50 µL) de filtrado fecal
Pocillo de problema 2	1 gota (50 µL) de antitoxina	1 gota (50 µL) de filtrado fecal

La dilución final del filtrado fecal en el pocillo es de 1/50. Utilizar puntas nuevas de pipeta con cada muestra. Debe tenerse en cuenta que: (i) debe utilizarse una serie de controles cada vez que se realice el análisis, y (ii) el resto del filtrado fecal debe refrigerarse a una temperatura de 2° a 8 °C durante un máximo de 48 horas por si fuera necesario realizar nuevos análisis.

3. Una vez aplicadas las muestras, incubar los pocillos a una temperatura de 37°C ± 2 °C durante 24 a 48 horas. Observar cada pocillo para comprobar si se produce el redondeo de las células, que indica la presencia de actividad citotóxica. El efecto citotóxico se considera positivo si se produce el redondeo de al menos el 50% de las células. Registrar los resultados de cada pocillo. El efecto citotóxico puede observarse a las 8 horas de la aplicación de la muestra si hay niveles altos de toxina. Sin embargo, las muestras no deben considerarse negativas hasta después de 48 horas.

CONTROL DE CALIDAD

Se efectuarán un control positivo y un control negativo con cada serie de muestras problema. Esto incluye la adición del *Control positivo de la toxina* a un pocillo que contiene tampón para demostrar la actividad y la adición del *Control positivo de la toxina* a un pocillo que contiene antitoxina para demostrar la neutralización de la actividad citotóxica. El control positivo debe mostrar el efecto de redondeo típico característico de la toxina de *C. difficile*. Los resultados del análisis no son válidos a menos que se cumplan estas características de rendimiento. Si no se cumplen las características del rendimiento, llame al servicio técnico y no notifique los resultados del análisis. A su recepción, debe inspeccionarse el kit para comprobar que los componentes han llegado en un estado satisfactorio. Los resultados del análisis, junto con los resultados de control, se registrarán y notificarán según los procedimientos internos y se conservarán según los procedimientos internos para futura referencia.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Pocillo con:		INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS
PBS	antitoxina de *C. difficile*	
-	-	Negativo: no hay actividad citotóxica.
+	-	Presencia de actividad citotóxica que es neutralizada por la antitoxina de *C. difficile* , lo cual confirma la presencia de la toxina de *C. difficile* en la muestra.
+	+	Resultados indeterminados que pueden deberse a niveles muy altos de la toxina de *C. difficile* . Debe diluirse el filtrado fecal a un nivel 1/10 adicional en *Diluyente* y debe repetirse el análisis para descartar esta posibilidad. En el segundo análisis en estas condiciones, si las células del pocillo que contiene PBS y filtrado fecal muy diluido muestran redondeo y las células del pocillo que contiene antitoxina y filtrado fecal muy diluido no muestran redondeo, la toxina de *C. difficile* está presente. Si las células de ambos pocillos están redondeadas, la muesatra presenta actividad citotóxica pero ésta no se debe a la toxina de *C. difficile* .

Resultados del control: Las células del pocillo que contiene PBS y *Control positivo de la toxina* deberían estar redondeadas. Las células del pocillo que contiene antitoxina de *C. difficile* y el *Control positivo de la toxina* deberían tener un aspecto normal, que demuestra la neutralización del *Control positivo de la toxina* por la antitoxina.

Resultado de la muestra problema: Si los filtrados de la muestra presentan signos de presencia de la toxina específica de *C. difficile*, la muestra debe clasificarse como "Muestra clínica positiva para la toxina de *Clostridium difficile*". Si los filtrados de la muestra no presentan signos de actividad citotóxica a las 48 horas, la muestra debe clasificarse como "No se ha detectado la toxina de *Clostridium difficile*". Si los filtrados de la muestra presentan signos de actividad citotóxica que no es neutralizada por la antitoxina de *C. difficile*, la muestra debe clasificarse como "Reacción inespecífica en la muestra clínica, no característica de la toxina de *Clostridium difficile*". Una segunda muestra puede ayudar a descartar la enfermedad causada por la toxina de *Clostridium difficile*.

LIMITACIONES DEL ANÁLISIS *C. DIFFICILE TOX-B TEST*

1. El análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST* se utiliza para detectar la toxina de *C. difficile* en muestras fecales. Debido a la naturaleza compleja de las heces, las muestras deben analizarse en las 24 horas siguientes a su recogida.
2. La detección de la toxina con este análisis depende de la actividad biológica de la toxina. Las muestras deben manipularse y conservarse correctamente de acuerdo con las recomendaciones para reducir al mínimo la inactivación de la toxina.
3. Algunas muestras pueden dar reacciones no concluyentes (por ejemplo, redondeo parcial de las células, estiramiento en lugar de redondeo). En estas condiciones, debe repetirse el análisis de la muestra o debe analizarse una muestra fresca. Otras pruebas que pueden utilizarse junto con el análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST* son el ELISA para la toxina A, el ELISA para las toxinas A y B, el aislamiento del microorganismo en medios selectivos y el análisis de aglutinación con látex para la detección del microorganismo.
4. Algunas cepas aisladas de *C. sordellii* producen el mismo tipo de redondeo de las células de cultivos tisulares que causan las cepas toxígenas de *Clostridium difficile* debido a las semejanzas de las toxinas de *C. sordellii* y *C. difficile*. No se han detectado las cepas de *C. sordellii* que producen estas toxinas relacionadas en pacientes con colitis y diarrea asociada a antibióticos.

VALORES ESPERADOS

La prevalencia de un resultado positivo con el análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST* en nuestros estudios clínicos varió entre el 5.8% y el 19%. La prevalencia variará de un lugar a otro, y es posible que los hospitales presenten tasas inferiores o superiores a las observadas en los centros en los que se realizó la evaluación del análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST*. La enfermedad por *Clostridium difficile* es, sobre todo, una enfermedad hospitalaria que afecta a pacientes ancianos, y los hospitales con cifras elevadas de pacientes ancianos pueden presentar tasas más altas. Es importante evaluar cualquier resultado junto con los síntomas clínicos, ya que en algunos adultos sanos y en un gran número de lactantes sanos (hasta el 50%) se obtienen resultados positivos para las toxinas A o B de *C. difficile*. Además, se han descrito tasas de portadores de *C. difficile* del 22% al 32% en pacientes con fibrosis quística (11-13).

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Se evaluó el rendimiento del análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST* en cuatro centros diferentes de Estados Unidos. Para el análisis, se comparó *C. DIFFICILE TOX-B TEST* con otra prueba de citotoxicidad para toxinas de *C. difficile* comercial, también basada en el análisis de cultivos tisulares. Todos los análisis de cultivos tisulares se realizaron con células de prepucio humanas. En la tabla 2 se presenta un resumen de los resultados de las investigaciones clínicas. Entre paréntesis se indica el intervalo de la

sensibilidad, la especificidad y la correlación relativas globales para las evaluaciones. En estudios realizados en centros de referencia en el nordeste y el sudeste de Estados Unidos y en un centro médico de la costa este que incluyeron un total de 427 muestras, el análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST* mostró una correlación relativa global del 100% con la otra prueba comercial. En un estudio realizado en un centro médico del medio-oeste que incluyó 517 muestras, el análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST* mostró una sensibilidad relativa global y una especificidad relativa global del 96.7% y del 98.5%, respectivamente. La correlación relativa global fue del 98.3%. Cuando las discrepancias se resolvieron con el cultivo toxigénico, la sensibilidad relativa global y la especificidad relativa global aumentaron a un 98.3% y un 98.7%, respectivamente, con una correlación relativa global del 98.6%.

Tabla 2

	Cultivo toxigénico/ Análisis de cytotoxicidad comercial	
	positivo	negativo
TOX-B TEST positivo	114	6
TOX-B TEST negativo	1	823

Sensibilidad relativa global	99.1% (98.3% a 100%)
Especificidad relativa global	99.3% (98.7% a 100%)
Correlación relativa global	99.3% (98.6% a 100%)
Número de muestras	944

REACTIVIDAD CRUZADA

Los filtrados tóxicos de *C. chauveoi, C. fallax, C. perfringens, C. septicum* y *C. spiroforme* no se neutralizaron con la antitoxina de *C. difficile*. Tampoco se neutralizaron la toxina alfa de *C. perfringens*, la colagenasa y la clostripaína de *C. histolyticum*, la toxina colérica, la toxina diftérica, la toxina seudoshigélica y la enterotoxina estafilocócica. El único microorganismo que se ha demostrado que presenta reactividad cruzada con el análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST* es *C. sordellii.* Ciertas cepas aisladas toxígenas de *C. sordellii* producen toxinas muy similares a las de *C. difficile*. La toxina hemorrágica (toxina HT) de *C. sordellii* es muy similar a la toxina A, mientras que la toxina letal (toxina LT) es muy similar a la toxina B. Los anticuerpos frente a las toxinas de *C. difficile* neutralizan las toxinas HT y LT de *C. sordellii*. No se ha relacionado *Clostridium sordellii* con la colitis ni con la diarrea asociada a antibióticos.

REPRODUCIBILIDAD Y PRECISIÓN

Se enviaron series idénticas de seis muestras fecales a tres laboratorios clínicos diferentes del medio-oeste, el sudeste y el nordeste de Estados Unidos. Los resultados del análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST* de los tres laboratorios coincidieron con los resultados obtenidos internamente. En un estudio interno se analizaron cinco muestras fecales positivas a las 0, 24, 48 y 72 horas con el análisis *C. DIFFICILE TOX-B TEST*. Estas muestras presentaron una positividad homogénea para la toxina de *C. difficile* en todos los intervalos de tiempo determinada por la neutralización de la actividad citotóxica. Las muestras se conservaron a 4 °C durante el análisis. En otros estudios internos se analizaron por duplicado tres lotes diferentes del reactivo de control positivo que mostraron títulos de citotoxicidad homogéneos de 10^5. Una evaluación posterior demostró que lotes diferentes de la antitoxina de *C. difficile* neutralizaron el *Control positivo de la toxina*.

C. DIFFICILE TOX-B TEST - DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der *C. DIFFICILE TOX-B TEST* ist für die gemeinsame Verwendung mit dem Gewebekultur-Zytotoxizitätstest für den Nachweis von *C. difficile*-Toxin B in Patientenproben bestimmt. Der Test dient als Hilfsmittel bei der Diagnose einer *C. difficile*-assoziierten Erkrankung, und seine Ergebnisse sind im Zusammenhang mit der Patientenanamnese zu betrachten.
FÜR DIE *IN-VITRO*-DIAGNOSE.

ERLÄUTERUNG

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 *Clostridium difficile* verursacht (1). Dieser Organismus ist ein opportunistisches anaerobes Bakterium, das sich im Darm ansiedelt, sobald die normale Darmflora durch das Antibiotikum verändert wird. Die Erkrankung ist auf die Toxine zurückzuführen, die der 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).

Clostridium difficile bildet noch ein zweites Toxin, das so genannte Toxin B. Toxin B, das als Zytotoxin des Organismus bezeichnet wird, ist ein Toxin, das durch den in vielen Labors eingesetzten Gewebekulturtest nachgewiesen wird. Die meisten *Clostridium difficile*-Stämme bilden entweder beide Toxine oder keines. Kürzlich wurden jedoch auch Toxin A-negative/Toxin B-positive Stämme identifiziert (4-7). Stämme, die hohe Toxin-A-Konzentrationen bilden, bilden auch hohe Konzentrationen an Toxin B. Ebenso bilden Stämme, die geringe Konzentrationen an Toxin A bilden, auch geringe Toxin B-Konzentrationen. Dies weist darauf hin, dass die Toxinbildung möglicherweise ähnlich geregelt wird. Tests für den Nachweis der beiden Toxine dienen als diagnostisches Hilfsmittel bei der Identifikation toxigener Stämme. Die Toxingene wurden geklont und sequenziert. Einige Eigenschaften der Toxine sind nun eindeutig definiert (8,9). Beide Toxine sind schwer (Molmasse von Toxin A: 308.000; Molmasse von Toxin B: 279.000). Beide Toxine weisen eine komplexe Serie an sich wiederholenden Einheiten am COOH-Terminus des Moleküls auf. Diese sich wiederholenden Einheiten dienen möglicherweise als Bindungsteil, das den Rezeptor erkennt (10). Einige Fakten weisen darauf hin, dass die Toxine A und B synergistisch wirken und die anfängliche, von Toxin A verursachte Gewebebeschädigung dem Toxin B die Aktivierung seiner Toxizität ermöglicht. Daher spielt Toxin B möglicherweise ebenfalls eine wichtige Rolle bei dieser Erkrankung, auch wenn der Großteil der klinischen Symptome Toxin A zugeschrieben werden.

Eine Reihe von Faktoren verkompliziert die von *Clostridium difficile* verursachte Erkrankung. Auch wenn der Organismus für beinahe alle Fälle von pseudomembranöser Kolitis verantwortlich ist, gehen Schätzungen davon aus, dass nur etwa 25% der Fälle von Antibiotika-assoziierter Diarrhöe von *C. difficile* verursacht werden. Zahlreiche Fälle von Antibiotika-assoziierter Diarrhöe sind daher auf andere Ursachen zurückzuführen. Toxigene *C. difficile*-Stämme reichen von schwach toxigenen Stämmen zu Stämmen, die extrem hohe Toxinkonzentrationen bilden. Es ist unklar, ob leichte, selbstlimitierende Fälle von Diarrhöe lediglich leichtere Formen der Krankheit darstellen, die durch eine Infektion mit schwach toxigenen Stämmen verursacht werden, oder ob das Vorhandensein toxigener *Clostridium difficile*-Stämme auf die Diarrhöe zurückzuführen ist.

Derzeit werden vier Verfahren für den Nachweis von *C. difficile* und seinen Toxinen in Stuhlproben angewandt. Diese umfassen (i) Isolierung des Organismus, (ii) Latex-Agglutination, (iii) Gewebekulturtest sowie (iv) ELISA für den Nachweis von Toxin A bzw. Toxin A und B. Isolierung des Organismus und Latex-Agglutination sind für

den Nachweis des Organismus in Stuhlproben hilfreich. Keines dieser Testverfahren zeigt jedoch das Vorhandensein von Toxin auf. Dazu müssen entweder ein Gewebekulturtest oder ein toxinspezifisches ELISA durchgeführt werden. Gewebekultur hat sich aufgrund der hohen Aktivität von *C. difficile* Toxin B in diesem Test als äußerst hilfreiches Verfahren erwiesen. Bereits ein Pikogramm Toxin reicht für eine positive Reaktion aus. Eine Neutralisierung der zytotoxischen Aktivität durch *C. difficile*-Antitoxin bestätigt das Vorhandensein von *C. difficile*-Toxin. Der Test dient als Hilfsmittel bei der Diagnose einer *C. difficile*-assoziierten Erkrankung, und seine Ergebnisse sind im Zusammenhang mit der Patientenanamnese zu betrachten. Grund dafür ist die Tatsache, dass einige Erwachsene asymptomatische Träger sind und nachweisbare Toxinkonzentrationen im Stuhl haben können, dabei jedoch keinerlei klinische Symptome aufweisen. Zudem kann bei zahlreichen gesunden Kleinkindern (bis zu 50%) *C. difficile*-Toxin im Stuhl vorhanden sein, ohne dass das Kind Krankheitszeichen zeigt.

TESTPRINZIP

Der *C. DIFFICILE TOX-B TEST* basiert auf einem Gewebekulturformat für den Nachweis von zytotoxischer Aktivität (erkennbar an der Zellrundung) in Stuhlproben und bestätigt das Vorhandensein von *Clostridium difficile*-Toxin unter Verwendung eines spezifischen Antitoxins. Zwei Reagenzien sind im *C. DIFFICILE TOX-B TEST* enthalten: die *positive Toxinkontrolle* und ein spezifisches Antitoxin zur Bestätigung des Vorhandenseins von *C. difficile*-Toxin mittels Neutralisierung der zytotoxischen Aktivität. Zudem ist ein *Verdünnungspuffer* für die Vorbereitung der Stuhlproben enthalten. Bei dem Test wird ein Aliquot einer Stuhlprobe im *Verdünnungspuffer* emulgiert und die verdünnte Probe zentrifugiert und gefiltert. Eine Filtratprobe wird in eine Gewebekulturvertiefung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) sowie in eine Vertiefung mit Antitoxin übertragen. Bei Vorhandensein von *C. difficile*-Toxin verursacht dieses eine Rundung der Zellen in der PBS-Vertiefung und weist somit auf die zytotoxische Aktivität hin. Das Vorhandensein von *Clostridium difficile*-Toxin wird bestätigt, wenn die zytotoxische Aktivität in der Vertiefung mit dem Antitoxin neutralisiert wird.

PACKUNGSINHALT

AT — ***C. difficile-Ziegenantitoxin***, 3,0 mL (mit Konservierungsmittel)

PBS — ***Phosphatgepufferte Kochsalzlösung* (PBS)**, 3,0 mL (mit Konservierungsmittel)

CONTROL + — ***Positive Toxinkontrolle***, 2,0 mL aktives *C. difficile*-Toxin in gepufferter Proteinlösung mit Konservierungsmittel.

DIL SPE — ***Verdünnungspuffer***, 100 mL (phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Konservierungsmittel und Phenolrot)

T5003 enthält eine ausreichende Menge an Reagenzien für zwei 48-Well Gewebekulturplatten.

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

Mikroskop zur Zellbeobachtung	Inkubator – auf 37°C ± 2°C eingestellt
Zentrifuge und Zentrifugenröhrchen	Pipetten/Pipettierer
Reagenzgläser zur Verdünnungsherstellung	Spritzenfilter (0,45 bis 0,8 µm)

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum des Testkits ist auf dem Packungsetikett angegeben. Die Verfallsdaten für die einzelnen Bestandteile sind auf den jeweiligen Etiketten angegeben. Verwenden Sie die Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums, da die Sensitivität abnimmt.

VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Verwenden Sie Stuhlproben innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Gefrorene Proben (≤ -20°C oder darunter) können aufgrund des Einfrier- und Auftauvorganges Aktivitätsverluste aufweisen. VERMEIDEN SIE WIEDERHOLTES EINFRIEREN UND AUFTAUEN DER PROBEN. DIES KANN ZU INAKTIVITÄT DES TOXINS FÜHREN.
2. Sämtliche Proben sind als potenziell infektiöses Material zu behandeln.
3. Die *positive Toxinkontrolle* enthält biologisch aktives Toxin und ist mit Vorsicht zu behandeln. Das Antitoxin stellt keine bekannte Gefahr dar.
4. Verwenden Sie die Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums.
5. Lagern Sie die Reagenzien nach Anweisung des Herstellers. Dies verlängert die Haltbarkeit der Reagenzien.
6. Stellen Sie die Reagenzien nach dem Testverfahren zurück in den Kühlschrank.

ENTNAHME UND HANDHABUNG DER STUHLPROBEN

Die üblichen Labormethoden für Entnahme und Handhabung von Stuhlproben sind geeignet. Die Proben müssen so rasch wie möglich transportiert und bei Temperaturen zwischen 2 °C und 8 °C gelagert werden. Nach Möglichkeit sollten die Stuhlproben beim Test weniger als 24 Stunden alt sein. Lagern Sie die Proben bei -20 °C oder darunter, wenn der Test nicht innerhalb von 48 Stunden durchgeführt werden kann. **Das Einfrieren und Auftauen, besonders wenn es mehrfach erfolgt, führt zu einem Aktivitätsverlust durch den Toxinzerfall.** Stellen Sie sicher, dass die Proben vor der Testdurchführung gründlich gemischt werden. Insbesondere müssen diese vor der Vorbereitung des Stuhlextraktes vollständig gemischt werden.

HANDHABUNG DER STUHLPROBEN

BITTE BEACHTEN: Testen Sie nach Möglichkeit nur Stuhlproben, die weniger als 24 Stunden alt sind. Die Proben müssen bis zum Test zwischen 2 °C und 8°C gelagert werden.

1. Bereiten Sie für jede zu testende Probe ein Reagenzglas vor. Geben Sie 1,8 mL *Verdünnungspuffer* in jedes Reagenzglas. Beschriften Sie das Reagenzglas direkt auf der Seite.
2. Übertragen Sie feste Stuhlproben mithilfe eines Stäbchens in das Reagenzglas. Überziehen Sie das Stäbchen vollständig, bevor Sie die Probe übertragen. Rühren Sie mit dem Stäbchen den Verdünnungspuffer und lösen Sie eine möglichst große Probenmenge ab. Drücken Sie das Stäbchen anschließend gegen das Reagenzglas, um Flüssigkeitsrückstände auszupressen. Bei flüssigen Stuhlproben übertragen Sie 0,2 ml Probe mithilfe einer Kunststoffpipette in das Reagenzglas (1/10 Verdünnung). Stellen Sie sicher, dass die Proben vor dem Übertragen gleichmäßig suspendiert werden.
3. Vortexen Sie die Reagenzgläser 10 Sekunden lang. Übertragen Sie ein Aliquot der Probe in ein Mikrozentrifugenröhrchen (z.B. Eppendorf) und zentrifugieren Sie die Probe 5 Minuten lang bei hoher Geschwindigkeit (2.000 bis 10.000 U/min) in einer Mikrozentrifuge.
4. Filtern Sie die Überstandsflüssigkeit durch eine 0,45 µm-Membran in ein steriles Reagenzglas. Lagern Sie das Filtrat zwischen 2 °C und 8 °C.

GEWEBEKULTURVERFAHREN

BITTE BEACHTEN: Das in der Folge erläuterte Verfahren kann für den Nachweis von *C. difficile*-Toxin in Stuhlproben mit dem *C. DIFFICILE TOX-B TEST* verwendet werden. Alternativ kann das Kit für andere modifizierte interne Verfahren verwendet werden. Es ist in jedem Falle wichtig, dass die *positive Toxinkontrolle* und die *Antitoxin-Reagenz* gemäß Anweisungen verwendet werden.

1. Legen Sie die Anzahl der zur Durchführung des Tests erforderlichen Vertiefungen fest. Für jeden Testdurchgang sind zwei Vertiefungen als Kontrollvertiefungen erforderlich. Zudem werden zwei Vertiefungen für jede Probe benötigt. Zu den im Allgemeinen verwendeten Gewebekulturzellen zählen u.a. menschliche Vorhautzellen, MRC-5, WI-38 sowie Ovarialzellen des chinesischen Hamsters.
2. Geben Sie 1 Tropfen (50 µl) PBS in eine der beiden Vertiefungen in jedem Set. Geben Sie 1 Tropfen (50 µl) *C. difficile*-Antitoxin in die andere Vertiefung in jedem Set. Bereiten Sie die Vertiefungen wie in Tabelle 1 dargestellt vor.

Tabelle 1.

Micropuits	PBS oder Antitoxin	Testprobe
Kontrollvertiefung 1	1 Tropfen (50 µL) PBS	1 Tropfen (50 µL) positive Kontrolle
Kontrollvertiefung 2	1 Tropfen (50 µL) Antitoxin	1 Tropfen (50 µL) positive Kontrolle
Testvertiefung 1	1 Tropfen (50 µL) PBS	1 Tropfen (50 µL) Stuhlfitrat
Testvertiefung 2	1 Tropfen (50 µL) Antitoxin	1 Tropfen (50 µL) Stuhlfitrat

Die Endverdünnung des Stuhlfiltrats in der Vertiefung beträgt 1/50. Benutzen Sie jeweils neue Pipettenspitzen für die Proben. Beachten Sie bitte, dass (i) ein Kontrollsatz bei jedem Testdurchgang zu verwenden ist und (ii) das restliche Stuhlfiltrat im Kühlschrank zwischen 2° und 8 °C bis zu 48 Stunden zu lagern ist, falls weitere Tests erforderlich sind.

3. Inkubieren Sie die Vertiefungen nach Auftragen der Proben bei 37 °C ± 2 °C 24-48 Stunden lang. Überprüfen Sie jede Vertiefung auf Zellrundung, die auf zytotoxische Aktivität hinweist. Die zytotoxische Wirkung gilt als positiv, wenn mindestens 50% der Zellen in der Vertiefung eine Rundung aufweisen. Zeichnen Sie die Ergebnisse für jede Vertiefung auf. Die zytotoxische Wirkung kann innerhalb von 8 Stunden nach Auftragen der Probe beobachtet werden, wenn hohe Toxinmengen vorhanden sind. Proben sollten in jedem Falle bis zu 48 Stunden nach dem Test nicht als negativ betrachtet werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jeder Testprobenserie müssen eine positive und negative Kontrolle mitgetestet werden. Dazu gehört die *positive Toxinkontrolle*, die einer Vertiefung mit Puffer für den Nachweis von Aktivität beigefügt wird, sowie eine *positive Toxinkontrolle*, die einer Vertiefung mit Antitoxin für den Nachweis der Neutralisierung der zytotoxischen Aktivität beigefügt wird. Die positive Kontrolle muss die für *C. difficile*-Toxin typische Rundung aufweisen. Die Testergebnisse sind nur dann gültig, wenn die Leistungsdaten erfüllt werden. Wenden Sie sich an den technischen Kundendienst, wenn die Leistungsdaten nicht erfüllt werden, und melden Sie die Testergebnisse nicht. Bei Erhalt muss das Kit überprüft werden, ob sich die Bestandteile in einwandfreiem Zustand befinden. Die Testergebnisse müssen zusammen mit den Kontrollergebnissen gemäß interner Verfahrensweise aufgezeichnet und gemeldet sowie für den späteren Gebrauch nach interner Verfahrensweise archiviert werden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Vertiefung enthält:		INTERPRETATION DER ERGEBNISSE
PBS	*C. difficile* - Antitoxin	
-	-	Negativ – keine zytotoxische Aktivität vorhanden
+	-	Zytotoxische Aktivität vorhanden, die von *C. difficile* -Antitoxin neutralisiert wurde, was das Vorhandensein von *C. difficile* -Toxin in den Stuhlproben bestätigt.
+	+	Uneindeutige Ergebnisse, die möglicherweise durch extrem hohe *C. difficile* -Toxinkonzentrationen verursacht wurden. Das Stuhlfiltrat muss um weitere 1/10 im Verdünnungspuffer verdünnt und der Test wiederholt werden, um diese Möglichkeit auszuschließen. Nach wiederholtem Testen unter diesen Bedingungen ist *C. difficile* -Toxin vorhanden, wenn die Zellen in den Vertiefungen mit PBS und dem hochverdünnten Stuhlfiltrat Rundungen aufweisen und die Zellen in der Vertiefung mit dem Antitoxin und hochverdünnten Stuhlfiltrat keine Rundungen aufweisen. Ist in beiden Vertiefungen eine Zellrundung zu beobachten, so enthält die Probe zytotoxische Aktivität, jedoch nicht aufgrund von *C. difficile* -Toxin.

Kontrollergebnisse: Die Zellen in der Vertiefung mit der PBS und *positiven Toxinkontrolle* müssen rund sein. Die Zellen in der Vertiefung mit dem *C. difficile*-Antitoxin und der *positiven Toxinkontrolle* müssen ein normales Erscheinungsbild und somit die Neutralisierung der *positiven Toxinkontrolle* durch das Antitoxin aufweisen.

Ergebnisse der Testproben: Weisen Probenfiltrate spezifisches *C. difficile* -Toxin auf, so verzeichnen Sie „Patientenprobe positiv für *Clostridium difficile*-Toxin". Weisen die Probenfiltrate nach 48 Stunden keine zytotoxische Aktivität auf, so verzeichnen Sie "Kein *Clostridium difficile*-Toxin nachgewiesen". Weisen die Probenfiltrate zytotoxische Aktivität auf, die nicht von *C. difficile* -Antitoxin neutralisiert wurde, so verzeichnen Sie „Nichtspezifische Reaktion in Patientenprobe, nicht charakteristisch für *Clostridium difficile*–Toxin." Eventuell sollte eine weitere Probe getestet werden, um eine durch *Clostridium difficile*-Toxin verursachte Erkrankung des Patienten auszuschließen.

GRENZEN DES *C. DIFFICILE TOX-B TESTS*

1. Der *C. DIFFICILE TOX-B TEST* dient zum Nachweis von *C. difficile*-Toxin in Stuhlproben. Aufgrund der komplexen Stuhlbeschaffenheit sollten die Proben nach Möglichkeit weniger als 24 Stunden alt sein.
2. Der Nachweis von Toxin mit diesem Test hängt von der biologischen Aktivität des Toxins ab. Die Proben müssen ordnungsgemäß gehandhabt und gemäß Anweisungen gelagert werden, um die Inaktivierung des Toxins so gering wie möglich zu halten.
3. Einige Proben liefern unter Umständen uneindeutige Reaktionen (z.B. partielle Rundung der Zellen, Dehnung statt Rundung). Unter diesen Bedingungen sollte die Probe nochmals getestet oder eine neue Stuhlprobe getestet werden. Zusätzliche Tests, die gemeinsam mit dem *C. DIFFICILE TOX-B TEST* durchgeführt werden können, sind das ELISA für Toxin A, ELISA für Toxin A und B, Isolierung des Organismus auf selektiven Medien sowie Latex-Agglutination für den Nachweis des Organismus.
4. Einige Isolate von *C. sordellii* bilden dieselbe Art von Rundung bei Gewebekulturzellen wie toxigene *C. difficile*. Dies ist auf die Ähnlichkeit zwischen den C. *sordellii*-Toxinen und *C. difficile*-Toxinen zurückzuführen. *C. sordellii*-

Stämme, die diese verwandten Toxine bilden, wurden nicht bei Patienten mit Antibiotika-assoziierter Diarrhöe und Kolitis nachgewiesen.

ERWARTUNGSWERTE

Die Prävalenz eines positiven *C. DIFFICILE TOX-B TESTS* in unseren klinischen Studien lag zwischen 5,8% und 19%. Die Prävalenz ist von Ort zu Ort unterschiedlich. Krankenhäuser können auch niedrigere oder höhere Raten als jene an den Studienstandorten im Rahmen der Beurteilung des *C. DIFFICILE TOX-B TESTS* festgestellten aufweisen. *Clostridium difficile* –assoziierte Erkrankungen treten vor allem als nosokomiale Infektionen bei älteren Patienten auf. Krankenhäuser mit einem höheren Anteil an älteren Patienten können daher höhere Raten aufweisen. Die Testergebnisse müssen immer gemeinsam mit klinischen Symptomen interpretiert werden, denn einige gesunde Erwachsene sowie viele gesunde Kleinkinder (bis zu 50 %) weisen ein positives Testergebnis für *C. difficile*-Toxin A oder B auf. Zudem wurde bei Mukoviszidose-Patienten eine *C. difficile*-Trägerrate von 22-32 % festgestellt (11-13).

LEISTUNGSDATEN

Die Leistung des *C. DIFFICILE TOX-B TESTS* wurde an vier verschiedenen Standorten in den USA beurteilt. Für die Analyse wurde der *C. DIFFICILE TOX-B TEST* mit einem anderen handelsüblichen Zytotoxitätstest für *C. difficile*-Toxine verglichen, bei dem es sich ebenfalls um einen Gewebekulturtest handelte. Alle Gewebekulturtests wurden unter Verwendung menschlicher Vorhautzellen durchgeführt. Eine Zusammenfassung der klinischen Forschungsergebnisse ist in Tabelle 2 dargestellt. Die Bereiche der relativen Gesamtsensitivität, Spezifität und Korrelation für die Beurteilungen sind in der Klammer angegeben. In Referenzlabors im Nordosten und Südosten der USA sowie einem medizinischen Zentrum an der Ostküste durchgeführten Studien mit insgesamt 427 Proben wies der *C. DIFFICILE TOX-B TEST* eine relative Gesamtkorrelation von 100% mit dem anderen handelsüblichen Test auf. Im Rahmen einer in einem medizinischen Zentrum im mittleren Westen durchgeführten Studie mit 517 Proben wies der *C. DIFFICILE TOX-B TEST* eine relative Gesamtsensitivität und –spezifität von 96,7% bzw. 98,5% auf. Die relative Gesamtkorrelation betrug 98,3%. Bei der Auflösung von abweichenden Proben mittels toxigener Kultur erhöhten sich die relative Gesamtsensitivität und –spezifität auf 98,3% bzw. 98,7%. Die relative Gesamtkorrelation betrug 98,6%.

Tabelle 2

	Handelsüblicher Zytotoxtätstest/Toxigene Kultur	
	Positiv	Negativ
TOX-B TEST Positiv	114	6
TOX-B TEST Negativ	1	823

Relative Gesamtsensitivität	99,1% (98,3% bis 100%)
Relative Gesamtspezifizität	99,3% (98,7% bis 100%)
Relative Gesamtkorrelation	99,3% (98,6% bis 100%)
Anzahl der Proben	944

KREUZREAKTIVITÄT

Toxische Filtrate aus *C. chauveoi*, *C. fallax*, *C. perfringens*, *C. septicum* und *C. spiroforme* wurden nicht durch das *C. difficile* –Antitoxin neutralisiert. Auch *C. perfringens* Alpha-Toxin, *C. Histolyticum* Kollagenase und Clostripain, Choleratoxin, Diphtherietoxin, Shigatoxin und Staphylokokkenenterotoxin wurden nicht neutralisiert. Der einzige Organismus mit bekannter Kreuzreaktivität im *C. DIFFICILE TOX-B TEST* ist *C. sordellii*. Bestimmte toxigene Isolate von C. *sordellii* bilden Toxine, die den *C. difficile*–Toxinen sehr ähnlich sind. Das hämorrhagische Toxin (HT) aus *C. sordellii* weist große Ähnlichkeit mit Toxin A auf, während das tödliche Toxin (LT) große

Ähnlichkeit mit Toxin B aufweist. *C. difficile*-Toxin-Antikörper neutralisieren HT und LT aus *C. sordellii*. *Clostridium sordellii* wurde nicht mit Antibiotika-assoziierter Diarrhöe und Kolitis in Verbindung gebracht.

REPRODUZIERBARKEIT UND PRÄZISION

Identische Probensets mit jeweils sechs Stuhlproben wurden in drei verschiedene klinische Labors im mittleren Westen, Südosten und Nordosten der USA eingesandt. Die Ergebnisse des *C. DIFFICILE TOX-B TESTS* aus den einzelnen Labors stimmten mit den intern erzielten Ergebnissen überein. Im Rahmen einer internen Studie wurden fünf positive Stuhlproben nach 0, 24, 48 und 72 Stunden mit dem *C. DIFFICILE TOX-B TEST* getestet. Diese Proben erwiesen sich bei jedem Zeitintervall als konsistent positiv für *C. difficile*-Toxin, wie mittels Neutralisierung der zytotoxischen Aktivität festgestellt wurde. Die Proben wurden während des Tests bei 4°C gelagert. Im Rahmen weiterer interner Studien wurden drei verschiedene Chargen der positiven Kontrollreagenz in doppelter Ausführung getestet, die konsistente Zytotoxizitätstiter von 10^5 ergaben. Weitere Evaluierungen zeigten, dass verschiedene Chargen des *C. difficile*-Antitoxins die *positive Toxinkontrolle* neutralisierten.

C. DIFFICILE TOX-B TEST - FRANÇAIS

UTILISATION PRÉVUE

Le *C. DIFFICILE TOX-B TEST* est conçu pour être utilisé en association avec l'essai de cytotoxicité par culture tissulaire permettant de détecter la toxine B du *C. difficile* dans les échantillons de selles des patients. Le test permet de diagnostiquer la maladie du *C. difficile* ; les résultats obtenus doivent néanmoins être évalués en association avec le passé médical du patient.

POUR UNE UTILISATION DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

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 provoqués par le *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. La maladie est le résultat des toxines produites par l'organisme. 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 *Clostridium 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. La plupart des souches du *Clostridium difficile* produisent soit les deux toxines, soit aucune d'entre elles, bien que des souches des toxines A négative/B positive aient été récemment identifiées (4-7). Les souches produisant des niveaux élevés de toxine A produisent également des niveaux élevés de toxine B. De la même façon, les souches produisant de faibles niveaux de toxine A produisent également de faibles niveaux de toxine B, ce qui indique que la production des toxines peut être régulée de manière semblable. Les tests permettant de détecter l'une ou l'autre de ces toxines sont utilisés en renfort dans le cadre de l'identification des souches toxinogènes. Les gènes des toxines ont été copiés et classés de sorte que certaines de leurs propriétés sont maintenant bien définies (8,9). D'un poids moléculaire de 308.000 et 279.000 respectivement, les toxines A et B sont de grosses toxines. Elles présentent toutes les deux une série complexe d'unités répétitives au niveau du COOH (acide carboxylique) terminal de la molécule, ces unités répétitives pouvant servir de partie d'attachement identifiant le récepteur (10). Certains indices suggèrent que les toxines A et B agissent en synergie et que les lésions tissulaires initiales dues à la toxine A permettent à la toxine B d'exercer sa toxicité. Par conséquent, bien que la toxine A soit tenue pour responsable de la plupart des symptômes cliniques, la toxine B peut également jouer un rôle important dans la maladie.

La maladie provoquée par le *Clostridium difficile* est aggravée par un certain nombre de facteurs. Bien que l'organisme soit à l'origine de la plupart des cas de colites pseudomembraneuses, on estime que le *C. difficile* n'est responsable que de 25% des cas de diarrhées associées aux antibiotiques. De nombreux cas de diarrhées associées aux antibiotiques sont donc imputables à d'autres causes. Les souches toxinogènes du *C. difficile* peuvent aller de « faiblement toxinogène » à des souches produisant des niveaux extrêmement élevés de toxine. Il est difficile de déterminer si les cas de diarrhée légère et limitée correspondent uniquement aux formes légères de la maladie provoquée par des infections dues à des souches faiblement toxinogènes ou si la présence du *Clostridium difficile* toxinogène est due à la diarrhée.

Il existe actuellement quatre méthodes permettant de détecter le *C. difficile* et ses toxines dans les échantillons de selles. Ces méthodes sont les suivantes : (i) isolement de l'organisme, (ii) agglutinement de latex, (iii) essais par culture tissulaire et (iv) test ELISA de détection de la toxine A ou des toxines A et B. L'isolement de l'organisme et l'agglutinement de latex permettent notamment de déceler la présence de l'organisme

dans les échantillons de selles. Cependant, aucun de ces essais ne démontre la présence de la toxine. À cet effet, il est nécessaire de recourir à des essais par culture tissulaire ou à l'utilisation d'un test ELISA de détection des toxines. Le procédé de culture tissulaire s'est avéré très efficace en raison de la forte activité de la toxine B du *C. difficile* lors des essais. Il suffit d'un seul picogramme de toxine pour obtenir une réaction positive. La neutralisation de l'activité cytotoxique par l'antitoxine du *C. difficile* confirme la présence de la toxine du *C. difficile*. Le test doit être utilisé pour permettre de diagnostiquer la maladie du *C. difficile* et les résultats doivent être évalués en association avec le passé médical du patient. En effet, certains adultes sont des porteurs asymptomatiques et leurs selles peuvent présenter des niveaux détectables de toxine sans que les sujets ne présentent de symptômes cliniques. Par ailleurs, la toxine du *C. difficile* peut être présente dans les selles de près de 50% des enfants sains sans qu'ils ne présentent le moindre signe de maladie.

PRINCIPE DU TEST

Le test *C. DIFFICILE TOX-B* est basé sur un format de culture tissulaire permettant de détecter l'existence d'une activité cytotoxique (mise en évidence par l'arrondissage des cellules) dans les échantillons de selles et de confirmer l'identification de la toxine du *Clostridium difficile* au moyen d'une antitoxine spécifique. Le test *C. DIFFICILE TOX-B* est fourni avec deux réactifs. Un réactif correspondant au *contrôle positif de la toxine*. Et un réactif spécifique à l'antitoxine utilisé pour confirmer la présence de la toxine du *C. difficile* par la neutralisation de l'activité cytotoxique. Un *diluant* permettant de préparer l'échantillon de selles est également fourni. Dans l'essai, une aliquote d'un échantillon de selles est émulsifiée dans le *Diluant,* puis l'échantillon dilué est centrifugé et filtré. Un échantillon de filtrat est introduit dans un micropuits de culture tissulaire contenant un tampon salin phosphaté (PBS) et dans un micropuits contenant l'antitoxine. En présence de la toxine du *C. difficile*, les cellules contenues dans le micropuits du PBS s'arrondiront, ce qui démontre l'existence d'une activité cytotoxique. La présence de la toxine du *Clostridium difficile* est confirmée si l'activité cytotoxique est neutralisée par l'antitoxine contenue dans l'autre micropuits.

MATÉRIEL FOURNI

AT — ***Antitoxine d'origine caprine contre C. difficile***, 3,0 ml (avec conservateur)

PBS — ***Tampon salin phosphaté* (PBS)**, 3,0 ml (avec conservateur)

CONTROL + — ***Contrôle positif de la toxine***, 2,0 ml de toxine *C. difficile* active dans une solution de protéine tamponnée contenant un conservateur.

DIL | SPE — ***Diluant***, 100 ml (tampon salin phosphaté contenant un conservateur et du rouge de phénol)

T5003 contient suffisamment de réactifs pour deux microplaques de 48 micropuits de culture tissulaire.

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

Microscope d'observation des cellules	Incubateur à 37°C ± 2°C
Centrifugeuse et tubes à centrifuger	Pipettes/Pipetteur
Tubes à essai pour la préparation des dilutions	Filtres pour seringue (0,45 à 0,8 µm)

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. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption pour éviter toute diminution de leur sensibilité.

PRÉCAUTIONS À PRENDRE

1. Utiliser les échantillons de selles dans les 24 heures suivant le prélèvement, et ce afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles. Les échantillons congelés (-20°C au moins) peuvent perdre de leur activité suite à la congélation et à la décongélation. ÉVITER LES CYCLES RÉPÉTÉS DE CONGÉLATION ET DE DÉCONGÉLATION DES ÉCHANTILLONS. CECI POURRAIT NEUTRALISER LA TOXINE.
2. Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux ; ils doivent donc être manipulés de façon appropriée.
3. Le *contrôle positif de la toxine* contient une toxine biologiquement active et doit être utilisé avec prudence. L'antitoxine ne présente aucun risque connu.
4. Ne pas utiliser les réactifs si leur date d'expiration est dépassée.
5. Entreposer les réactifs conformément aux recommandations du fabricant de façon à en prolonger la durée de conservation.
6. Remettre les réactifs au réfrigérateur dès que la procédure de test est terminée.

PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

Les procédures standard utilisées sur place pour le prélèvement et la manipulation des échantillons de selles sont appropriées. Les échantillons doivent être transportés le plus rapidement possible et stockés à une température comprise entre 2 et 8°C. Utiliser de préférence des échantillons de selles de moins de 24 heures. Conserver les échantillons à -20°C au moins si le test ne peut être réalisé dans un délai de 48 heures après le prélèvement. **La congélation et la décongélation de l'échantillon, en particulier si elles sont répétées, peuvent entraîner une perte d'activité due à la dégradation de la toxine.** Veiller à ce que les échantillons soient bien mélangés avant de réaliser l'essai, ce qui signifie que l'échantillon doit être complètement mélangé avant la préparation de l'extrait de selles.

TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

REMARQUE : Les tests doivent de préférence être effectués sur des échantillons de selles de moins de 24 heures. Les échantillons doivent être stockés à une température de 2° à 8°C jusqu'au moment du test.

1. Préparer un tube pour chaque échantillon à tester. Ajouter 1,8 ml de *Diluant* dans chaque tube. Apposer une étiquette sur le côté de chaque tube.
2. Pour les échantillons de selles formés, introduire l'échantillon dans le tube à l'aide d'une tige. Enduire complètement la tige avant de transférer l'échantillon. Agiter la tige dans le diluant de façon à récolter toute la matière possible puis frotter la tige contre le bord du tube pour récupérer un maximum de liquide résiduel. Pour les échantillons de selles liquides, utiliser une pipette en plastique pour transférer un échantillon de 0,2 ml dans le tube (dilution 1:10). Vérifier que les échantillons liquides sont parfaitement suspendus avant transfert.
3. Agiter les tubes pendant 10 secondes. Transférer une partie aliquote de l'échantillon dans un tube microcentrifuge (un tube Eppendorf, par exemple) et centrifuger l'échantillon pendant 5 minutes à haute vitesse (2000 à 10000 tours/min) dans une microcentrifugeuse.
4. Collecter le liquide surnageant et le filtrer à l'aide d'une membrane de 0,45 µm dans un tube stérile. Conserver le filtrat à une température comprise entre 2° et 8°C.

PROCÉDURE DE CULTURE TISSULAIRE

REMARQUE : La procédure décrite ci-dessous peut être appliquée pour détecter la toxine du *C. difficile* dans les échantillons de selles à l'aide du test *C. DIFFICILE TOX-B*. Ce kit peut également être utilisé suivant d'autres procédures internes modifiées. Il faut toutefois souligner que le *contrôle positif de la toxine* et le réactif antitoxine doivent être utilisés conformément aux consignes indiquées.

1. Déterminer le nombre de micropuits nécessaires à la réalisation du test. Chaque exécution du test requiert deux micropuits de contrôle. Il faut également prévoir deux micropuits par échantillon. Les cellules cultivées normalement utilisées correspondent à des cellules de prépuce humain, MRC-5, WI-38 et d'ovaire de hamster chinois.
2. Verser 1 goutte (50 µl) de PBS dans l'un des deux micropuits de chaque ensemble. Verser 1 goutte (50 µl) d'antitoxine *C. difficile* dans l'autre micropuits de chaque ensemble. Placer les micropuits comme illustré au tableau 1.

Tableau 1.

Micropuits	PBS ou Antitoxine	Échantillon testé
Micropuits de contrôle 1	1 goutte (50 µL) de PBS	1 goutte (50 µL) de contrôle positif
Micropuits de contrôle 2	1 goutte (50 µL) d'antitoxine	1 goutte (50 µL) de contrôle positif
Micropuits de test 1	1 goutte (50 µL) de PBS	1 goutte (50 µL) de filtrat de selles
Micropuits de test 2	1 goutte (50 µL) d'antitoxine	1 goutte (50 µL) de filtrat de selles

La dilution finale du filtrat de selles contenu dans le micropuits est de 1:50. Utiliser de nouveaux embouts de pipette pour chaque échantillon. Veuillez noter (i) qu'un ensemble de contrôle doit être prévu à chaque exécution du test et que (ii) le filtrat de selles restant doit être réfrigéré entre 2° et 8°C pendant 48 heures maximum au cas où il serait nécessaire d'effectuer un nouveau test.

3. Après application des échantillons, laisser incuber les micropuits à 37°C ± 2°C pendant 24 à 48 heures. Observer l'arrondissage des cellules dans chaque micropuits, celui-ci indiquant l'existence d'une activité cytotoxique. L'effet cytotoxique est considéré positif si au moins 50% des cellules contenues dans un micropuits sont arrondies. Enregistrer les résultats de chacun des micropuits. L'effet cytotoxique peut être observé au bout de 8 heures après application de l'échantillon si celui-ci contient un taux de toxine élevé. Cependant, les échantillons ne peuvent être considérés négatifs qu'après 48 heures d'incubation.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Les contrôles positifs et négatifs doivent être effectués sur chaque série d'analyses d'échantillons. Ceci inclut le *contrôle positif de la toxine* à introduire dans le micropuits contenant le tampon pour démontrer l'existence d'une activité, et le *contrôle positif de la toxine* à introduire dans le micropuits contenant l'antitoxine pour démontrer la neutralisation de l'activité cytotoxique. Le contrôle positif doit en principe révéler l'effet d'arrondissage caractéristique de la toxine du *C. difficile*. Les résultats des essais ne sont admissibles que si ces caractéristiques sont réunies. Dans le cas contraire, veuillez contacter nos services techniques et ignorer les résultats obtenus. Le kit doit être inspecté dès réception de façon à vérifier que tous ses composants sont en parfait état de fonctionnement. Les résultats des tests et des contrôles doivent être consignés et archivés conformément aux procédures internes de l'établissement pour toute référence ultérieure.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Contenu du micropuits :		INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS
PBS	Antitoxine *C. difficile*	
-	-	Négatif - Pas d'activité cytotoxique
+	-	Activité cytotoxique neutralisée par l'antitoxine du *C. difficile* confirmant la présence de la toxine du *C. difficile* dans l'échantillon
+	+	Résultats indéterminés pouvant être provoqués par des niveaux extrêmement élevés de toxine du *C. difficile* . Le filtrat de selle doit être dilué à 1:10 supplémentaire à l'aide du diluant et le test doit être répété afin d'écarter cette possibilité. En renouvelant le test sous ces conditions, si les cellules du micropuits contenant le PBS et le filtrat de selle très dilué sont arrondies et les cellules du micropuits contenant l'antitoxine et le filtrat de selle très dilué ne le sont pas, la toxine *C. difficile* est présente. Si les cellules des deux micropuits sont arrondies, l'échantillon de selle contient une activité cytotoxique, mais celle-ci n'est pas imputable à la toxine *C. difficile* .

Résultat des contrôles : Les cellules du micropuits contenant le PBS et le *contrôle positif de la toxine* doivent être arrondies. Les cellules du micropuits contenant l'antitoxine du *C. difficile* et le *contrôle positif de la toxine* doivent présenter un aspect normal, ce qui démontre la neutralisation du *contrôle positif de la toxine* par l'antitoxine.

Résultat observés sur les échantillons : Lorsque les échantillons de selles filtrés révèlent la présence de la toxine du *C. difficile*, consigner que « Les selles du patient sont *C. difficile*-positives ». Lorsque les échantillons de selles filtrés ne présentent aucun indice d'activité cytotoxique au bout de 48 heures, consigner « Selles *C. difficile*-négatives ». Lorsque les échantillons de selles filtrés présentent des indices d'activité cytotoxique non neutralisée par l'antitoxine du *C. difficile*, consigner « Réaction non spécifique des selles du patient, non caractéristique de la toxine du *C. difficile* ». Un essai supplémentaire sur le même prélèvement peut permettre de déterminer si l'affection du patient est due à la toxine du *Clostridium difficile*.

LIMITATIONS DU TEST *C. DIFFICILE TOX-B*

1. Le test *C. DIFFICILE TOX-B* est utilisé pour détecter la toxine du *C. difficile* dans des échantillons de selles. En raison de leur complexité, les échantillons de selles doivent être testés dans les 24 heures après leur prélèvement.
2. La détection de la toxine au moyen de ce test dépend de l'activité biologique de celle-ci. Les échantillons doivent être correctement manipulés et stockés afin de réduire au maximum tout risque d'inactivation de la toxine.
3. Certains échantillons peuvent réagir de façon peu concluante (par exemple, arrondissage partiel des cellules, allongement des cellules au lieu d'arrondissage). Le cas échéant, un nouveau test doit être effectué sur le même échantillon ou sur un échantillon frais. Des essais complémentaires peuvent être utilisés en association avec le test *C. DIFFICILE TOX-B* : le test ELISA spécifique à la toxine A, le test ELISA spécifique aux toxines A et B, l'isolement de l'organisme dans un milieu sélectif ou l'essai d'agglutinement de latex permettant de détecter l'organisme.
4. Certains isolats de *C. sordellii* produisent le même type d'arrondissage que le *C. difficile* toxinogène sur des cellules obtenues par culture tissulaire ; ceci est dû aux

similitudes existant entre les toxines du *C. sordellii* et celles du *C. difficile*. Aucune souche de *C. sordellii* produisant ces toxines associées n'a été détectée chez les patients présentant des diarrhées et des colites associées aux antibiotiques.

VALEURS ATTENDUES

Dans le cadre de nos études cliniques, la prévalence de résultats positifs avec le test *C. DIFFICILE TOX-B* était de 5,8% à 19%. La prévalence peut varier d'un site à un autre, les hôpitaux pouvant constater des taux inférieurs ou supérieurs à ceux observés aux endroits où l'évaluation du test *C. DIFFICILE TOX-B* a été réalisée. Le *Clostridium difficile* est une maladie nosocomiale principalement détectée chez les personnes âgées. Les hôpitaux accueillant une population plus importante de patients âgés peuvent donc présenter un taux plus élevés de cas. Il est important de considérer les résultats des tests en association avec les symptômes cliniques car certains adultes sains et un grand nombre d'enfants sains (jusqu'à 50 %) présentent des résultats positifs au toxines A ou B du *C. difficile*. Par ailleurs, on a pu observer des taux compris entre 22 et 32 % de *C. difficile* chez des patients atteints de mucoviscidose (11-13).

EFFICACITÉ DU TEST

L'efficacité du test *C. DIFFICILE TOX-B* a été évaluée sur quatre sites différents aux États-Unis. Aux effets de cette analyse, le test *C. DIFFICILE TOX-B* a été comparé à un autre test commercial de cytotoxicité des toxines *C. difficile*, ce test étant également basé sur la culture de tissus. Toutes les analyses de tissus ont été réalisées sur des cellules de prépuce humain. Les résultats de ces recherches cliniques sont résumés au tableau 2. La sensibilité, la spécificité et la corrélation relatives globales des évaluations sont présentées entre parenthèses. Dans le cadre des études menées dans différents centres de référence situés dans le nord-est et dans le sud-est des États-Unis et dans un centre hospitalier de la côte est, 427 échantillons ont été soumis au test *C. DIFFICILE TOX-B*, obtenant une corrélation relative globale de 100% avec l'autre test commercial. Une étude menée dans un centre hospitalier du centre-ouest, 517 échantillons ont été soumis au test *C. DIFFICILE TOX-B*, obtenant une sensibilité et une spécificité relatives globales de 96,7% et 98,5%, respectivement. La corrélation relative globale était de 98,3%. Après résolution par culture toxinogène des essais contradictoires, la sensibilité et la spécificité relatives globales sont montées jusqu'à 98,3% et 98,7%, avec une corrélation relative globale de 98,6%.

Tableau 2

		Tests commerciaux de cytotoxicité Test/Culture toxinogène	
		positif	négatif
TOX-B TEST	positif	114	6
	négatif	1	823

Sensibilité relative globale	99,1% (98,3% à 100%)
Spécificité relative globale	99,3% (98,7% à 100%)
Corrélation relative globale	99,3% (98,6% à 100%)
Nombre d'échantillons	944

RÉACTIVITÉ CROISÉE

Les filtrats toxiques de *C. chauveoi*, *C. fallax*, *C. perfringens*, *C. septicum* et *C. spiroforme* n'ont pas été neutralisés par l'antitoxine de *C. difficile*. Par ailleurs, l'alphatoxine de *C. perfringens*, de collagénase et de clostripaine du *C. histolyticum*, la toxine du choléra, de la diphtérie, de la vérotoxine et l'entérotoxine staphylococcique n'ont pas été neutralisées. Le seul organisme connu présentant une réaction croisée au test *C. DIFFICILE TOX-B* est le *C. sordellii*. Certains isolats toxinogènes de *C. sordellii* produisent des toxines très semblables aux

toxines du *C. difficile*. La toxine hémorragique (toxine HT) du *C. sordellii* est très similaire à la toxine A alors que la toxine létale (toxine LT) est très similaire à la toxine B. Les anticorps contre les toxines du *C. difficile* neutralisent les toxines HT et LT du *C. sordellii*. Le *Clostridium sordellii* n'a pas été détecté chez les patients présentant des diarrhées et des colites associées aux antibiotiques.

REPRODUCTIBILITÉ ET PRÉCISION

Des séries identiques de six échantillons de selles ont été envoyés à trois laboratoires cliniques différents situés dans le centre-ouest, le sud-est et le nord-est des États-Unis. Les résultats des tests *C. DIFFICILE TOX-B* de chaque laboratoire étaient conformes aux résultats obtenus en interne. Lors d'une étude interne menée par TECHLAB®, Inc., cinq échantillons de selles positifs on été testés à 0, 24, 48, et 72 heures au moyen du test *C. DIFFICILE TOX-B*. Ces échantillons se sont avérés systématiquement *C. difficile*-positifs pour chacune des durées indiquées, comme déterminé par la neutralisation de l'activité cytotoxique. Les échantillons ont été stockés à 4°C pendant la durée des essais. Lors d'études internes complémentaires, trois lots différents de réactif de contrôle positif ont été soumis à deux essais et ont systématiquement produit des titres cytotoxiques de 10^5. Des évaluations supplémentaires ont démontré que différents lots d'antitoxine *C. difficile* neutralisaient le *contrôle positif de la toxine*.

BIBLIOGRAPHY [For details on *C. difficile* disease, see our 1988 review (1)]

1. Lyerly, D.M., H.C. Krivan and T.D. Wilkins. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. **1**: pp. 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. Lyerly, D.M., L.M. Neville, D.T. Evans, J. Fill, S. Allen, W. Greene, R. Sautter, P. Hnatuck, D.J. Torpey, and R. Schwalbe. 1998. Multicenter Evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B TEST. J. Clin. Micro. **36**:184-190.
8. 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.
9. Barroso, L.A., S.Z. Wang, C.J. Phelps, J.L. Johnson and T.D. Wilkins. 1990. Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. Nucl. Acids. Res. **18**:4004.
10. Krivan, H.C., G.F. Clark, D.F. Smith, and T.D. Wilkins. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycocongugate containing the sequence Galα1-3Galβ1-4GlcNac. Infect. Immun. **53**: 573-581.
11. Peach, S.L., S.P. Borriello, H. Gaya, F.E. Barclay and A.R. Welch. 1986. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* in cystic fibrosis patients. J. Clin. Path. **39**: 1013-1018.
12. Welkon, C.J., S.S. Long, C.M. Thompson, Jr. and P.H. Gilligan. 1985. *Clostridium difficile* in patients with cystic fibrosis. Amer. J. Dis. Child. **139**: 805-808.
13. Wu, T.C., V.P. McCarthy and V.J. Gill. 1983. Isolation rate and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. **148**:176.

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 and Alere are trademarks of the Alere group of companies.

The TECHLAB Logo and TECHLAB are trademarks of TECHLAB®, Inc., under license.

© 2015 TECHLAB®, Inc. All rights reserved.

RMS #92-002-06 **Issued: 05/2015**