

PREMIER™ TOXINS A & B

REF Catalogue number 616096

IVD In vitro Diagnostic Medical Device

Enzyme Immunoassay for the Detection of *Clostridium difficile* Toxin A and Toxin B in Stool Specimens

INTENDED USE

Premier Toxins A&B is a qualitative enzyme immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B in stool from patients with antibiotic-associated diarrhea. Premier Toxins A&B is intended for use as an aid in the diagnosis of *C. difficile* associated disease (CDAD).

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Toxigenic *Clostridium difficile* is a major cause of antibiotic-associated diarrhea and colitis¹ and is the causative agent for virtually all cases of pseudomembranous colitis.^{2,3} Although about 2% of normal healthy adults are colonized with *C. difficile*,⁴ many patients acquire this organism through nosocomial infection.⁵ Exposure to most antibiotics is thought to allow proliferation of toxigenic *C. difficile* by disrupting the normal intestinal flora.⁶ Two toxins, toxin A and toxin B, are associated with disease caused by *C. difficile*.⁷ These toxins are immunologically and biologically distinct. Antiserum prepared against purified toxin A or toxin B does not cross-react with the other toxin.⁸ Toxin A has been described as an enterotoxin and causes an increase in intestinal permeability with subsequent enteric fluid accumulation and diarrhea.⁹ Toxin B is a potent cytotoxin which causes rounding of cells in culture.^{7,10} In hamsters, toxin B is lethal when administered intravenously by itself or intragastrically if combined with sublethal doses of toxin A.¹¹ The contribution of toxin B to the development of disease in the gut is not understood. It has, however, been hypothesized that the two proteins may act synergistically *in vivo*.^{11,12}

The most frequently used test in the diagnosis of *C. difficile* colitis is determination of toxin B in patients' stool by cell culture with neutralization of the toxin by specific antiserum. Although this assay is extremely sensitive, and the presence of toxin B has a positive correlation to 90-100% of patients with severe disease,^{1,7} it requires cell culture capability and up to 72 hours of incubation. In addition, the cytotoxin assay is not standardized and the procedures and cell lines used vary considerably.⁹

BIOLOGICAL PRINCIPLES

Premier Toxins A&B is an enzyme immunoassay for the direct detection of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B in stool samples. Breakaway microwells are coated with toxin specific monoclonal and polyclonal antibodies. Diluted patient specimens and HRP-conjugated anti-toxin A and B polyclonal antibodies are added to microwells. If either toxin is present in the diluted patient samples, HRP-conjugated toxin polyclonal antibodies (specific for both toxins) complexes are formed which remain in the microwells after washing. After a final washing step, a substrate/chromagen (peroxide and tetramethylbenzidine) is added to the wells. Any bound conjugate converts the substrate/chromagen to a blue color. Addition of acid (Stop Solution I) converts the blue to a yellow color.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

1. **Premier Toxins A&B Antibody-coated Microwells** – Breakaway plastic wells coated with mouse monoclonal anti-toxin A antibody and polyclonal goat anti-toxin B antibody.
2. **Premier Toxins A&B Positive Control** – Inactivated toxin A and B in buffered protein solution containing gentamicin and thimerosal (0.02%) as preservatives.
3. **Premier Toxins A&B Sample Diluent/Negative Control** – Buffered protein solution containing gentamicin and thimerosal (0.02%) as preservatives.
4. **Premier 20X Wash Buffer II** – Concentrated wash buffer containing thimerosal (0.2%) as a preservative.
5. **Premier Toxins A&B Enzyme Conjugate** - Polyclonal goat anti-toxin A and anti-toxin B antibodies conjugated to horseradish peroxidase in buffered protein solution containing gentamicin and thimerosal (0.02%) as preservatives.
6. **Premier Substrate I** - Buffered solution containing peroxide and tetramethyl benzidine.
7. **Premier Stop Solution I** – 1M Phosphoric acid. CAUTION: Avoid contact with skin. Flush with water if contact occurs.
8. **Sample Transfer pipettes**
9. **Microwell plate sealers**

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

MATERIALS NOT PROVIDED

1. Test tubes for dilution of sample
2. Distilled or deionized water
3. OPTIONAL: EIA microwell reader capable of reading absorbance at 450 nm or 450/630 nm*
4. Squirt bottle
5. Pipettes and graduated cylinder for making 1X Wash Buffer
6. Wooden applicator sticks
7. Absorbent paper
8. Incubator 37 ± 2 C
9. Timer
10. Vortex mixer
11. Waste container with disinfectant (ie, 10% solution of household bleach) and/or autoclavable biohazard bags

12. Disposable gloves
13. OPTIONAL: Centrifuge
14. OPTIONAL: Stat Fax™ - 2200 Incubator/Shaker for use in 20 minute incubation procedure*
15. OPTIONAL: Semiautomated microplate washer*

* It is the operator's responsibility to validate the semiautomated microplate washer, incubators and readers prior to their use with this product.

Stat Fax™ is a trademark of Awareness Technology, Inc.

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Kit reagents should be warmed to room temperature (21-27 C) and gently mixed before use.
3. Do not mouth pipet samples or reagents. Avoid contact with skin or mucous membranes.
4. Do not smoke, drink or eat in areas where specimens or kit reagents are handled.
5. Wear disposable gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards.
6. Do not interchange the microwells, Enzyme Conjugate, Substrate I, and Positive Control reagents between lots. (The Sample Diluent/Negative Control, 20X Wash Buffer II and Stop Solution I are interchangeable provided the reagents are within their assigned expiration dates.)
7. Do not use kit beyond the expiration date given on the kit label.
8. Stop Solution I contains 1M phosphoric acid. If contact with skin or mucous membranes occurs, flush with water immediately.
9. Patient specimens may contain infectious agents and should be handled at Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/NIH manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories," 2007.
10. Avoid splashing or forming of aerosols when handling, diluting or transferring specimens.
11. Avoid microbial contamination of reagents or incorrect results may occur.
12. Transfer pipettes provided must be used for specimen preparation and transfer. Use 1 per specimen. Cross contamination of samples or reagents may cause incorrect results.
13. **All stool samples must be mixed thoroughly, regardless of consistency, to insure a representative sample prior to pipeting.**
14. Reagent concentration, incubation times and temperatures have been optimized for sensitivity and specificity. Best results are obtained by adhering to these specifications.
15. Positive Control contains inactivated toxin A and toxin B. However, it should be handled as a potential biohazard.
16. Hold all vials vertically to insure proper drop size and delivery.
17. Do not allow the tips of any vial to touch the microwells.
18. Replace colored caps on correct vials.
19. All reagents are provided already diluted to the proper concentration (except the Premier 20X Wash Buffer II). Do not dilute further.
20. Any deviation below or above set incubation times may affect sensitivity and specificity and should be avoided.
21. Do not use microwells if the foil pouch appears damaged (ie, has holes, punctures).

RISK AND SAFETY PHRASES

20X WASH BUFFER II CONTAINS THIMEROSAL - HARMFUL

RISK PHRASES:

20/21/22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed
33 Danger of cumulative effects

SAFETY PHRASES:

36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

SHELF LIFE AND STORAGE

1. Store all kit reagents at 2-8 C. Return kit to the refrigerator promptly after use.
2. Keep microwells in their pouch until the pouch reaches room temperature to avoid condensation. Return all unused microwells and the desiccant to the ziplock pouch and seal tightly.
3. Diluted Wash Buffer II may be kept at room temperature and used for up to three months.

SPECIMEN HANDLING

Collect stool specimens into a clean, airtight container with no preservative. All stool specimens should be stored at 2-8 C and tested as soon as possible. Ideally, stool specimens should be tested within 24 hours but specimens may be held at 2-8 C for up to 72 hours prior to testing. If specimens cannot be tested within 72 hours, they should be frozen **immediately upon receipt** at -20 C or colder. A single freeze thaw cycle should not affect results.¹³ Repeated freezing and thawing of samples should be avoided. Use only the Sample Diluent provided with this kit for diluting specimens. Specimen can be stored diluted in Sample Diluent in a sealed tube (as described in **SPECIMEN PREPARATION** below) for up to 8 hours at 2-8 C.

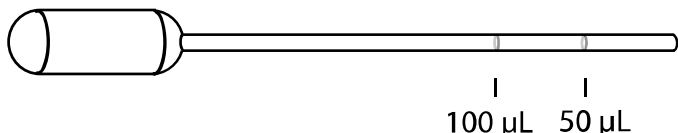
REAGENT PREPARATION

1. Bring the entire kit, including microwell pouch, to room temperature (21-27 C) before use. Return to 2-8 C immediately after use.
2. Prepare decontamination vessel for discarding reagents and materials.
3. Do not allow microwells to dry out between steps.
4. Reproducibility in any EIA is largely dependent on the consistency and thoroughness with which the microwells are washed. Carefully follow the recommended wash procedure as outlined in the EIA test procedure. An automated washer may be used.
5. Prepare 1X Wash Buffer as needed. For example: 5.0 mL of 20X Wash Buffer II + 95.0 mL of distilled or deionized wash is sufficient to wash 1 strip. Place in clean squirt bottle. The 1X Wash Buffer can be stored at 21-27 C for up to 3 months.

- One Positive and 1 Negative Control well must be included with each run of specimens. Use the Positive Control as provided. **DO NOT DILUTE.**
- Use EIA plate sealers to cover the assay during incubation steps. Cut to size, then remove paper backing before use.

SPECIMEN PREPARATION (1:5 Sample Dilution)

- Add 200 μ L of Sample Diluent to a clean test tube with dropper assembly (or equivalent).
- Mix stool as thoroughly as possible prior to pipeting.**
 - For liquid or semi-solid stool:** Using the disposable transfer pipettes and measuring to the 1st calibration mark (50 μ L), transfer 50 μ L of stool into the dilution tube containing Sample Diluent. Rinse the transfer pipette by drawing the stool suspension in and out of the pipette several times. Remove pipette and vortex the suspension thoroughly (15 seconds), and replace pipette in tube.
 - Solid Stools:** Using a wooden applicator stick, transfer a small 3-4 mm diameter portion of thoroughly mixed stool into Sample Diluent. Emulsify stool using the wooden applicator stick then vortex 15 seconds. Place a transfer pipette in the tube. Promptly proceed to assay.
- Stool specimens may be centrifuged after dilutions. Centrifuge at approximately 2750 x G for 5 minutes or until solid matter separates from liquid. Proceed with the assay after recovering the supernate.



TEST PROCEDURE

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

NOTE: With large numbers of specimens, repetitive or multichannel pipettes may be used for dispensing the reagents.

- After the pouch has reached 21-27 C, break off the required number of microwells (1 well for each specimen plus 1 positive and 1 negative control well per batch). Place the microwells in the microwell strip holder and record the location of all wells. Unused microwells must be resealed in the pouch immediately (see **SHELF LIFE AND STORAGE**).
- Using the original transfer pipette, draw up diluted stool to the 100 μ L calibration point (2nd mark from tip of the pipette) and add to the appropriate well (place pipette tip halfway into well and let sample slowly run down side of well).
- Add 2 free-falling drops of Positive Control to the appropriate well. Add 100 μ L (2nd mark on transfer pipette) of Negative Control (Sample Diluent) to the appropriate well.
- Add 1 free-falling drop of Enzyme Conjugate (50 μ L) to all wells. Mix wells by firmly shaking/swirling the plate for 30 seconds.
- Cut plate sealer to size and press firmly onto top of microwells to seal. Incubate the plate for 50 minutes at 35-39 C. **Alternatively, laboratories equipped with a heated plate shaker (Stat Fax™-2200) can incubate and rotate the plate for 20 minutes at 37 C at 1000 rpm (setting #5).**
- Carefully**, remove the plate sealer and wash wells (see **REAGENT PREPARATION**):
 - Dump plate contents firmly into a biohazard receptacle.
 - Bang the inverted plate on a clean stack of paper towels
 - Fill all wells with 1X Wash Buffer directing stream of buffer to the sides of the wells to avoid foaming. Immediately proceed to Step 6.d.

OPTIONAL: Alternatively, a semi-automated plate washer may be used. Select the appropriate setting according to manufacture instructions. After automated washing is complete, proceed to Step 7.

 - Repeat wash cycle (dump, bang on fresh towels, fill) 4 to 6 times (for a total of 5-7 washes). After the last fill, dump and bang plates on fresh towels hard enough to remove as much excess wash buffer as possible but do not allow wells to completely dry at any time.
- Clean the underside of all wells with a lint free tissue.
- Add 2 free-falling drops of Substrate I (100 μ L) to each well.
- Firmly shake/swirl the plate for 10-15 seconds then incubate for 10 minutes at 21-27 C.
- Add 2 free-falling drops of Stop Solution I (100 μ L) to all wells. Shake/swirl the plate firmly for 30 seconds to assure complete mixing. After addition of Stop Solution I, wait 2 minutes before reading (Step 11). **NOTE:** initial color of positive reaction is blue, which changes to yellow upon addition of Stop Solution I.
- Observe reactions:
 - Visual Determination – Read within 15 minutes after adding Stop Solution I.
 - Spectrophotometric Determination – Zero EIA reader on air. Wipe the underside of wells with a lint free tissue. Read absorbance at 450 nm or 450/630 nm within 30 minutes of adding Stop Solution I.

INTERPRETATION OF RESULTS

- Visual Reading**
 Negative = colorless to faint (barely visible) yellow
 Positive = definite yellow color
- Spectrophotometric Single Wavelength (450 nm)**
 Negative = $OD_{450} < 0.150$
 Positive = $OD_{450} \geq 0.150$

3. Spectrophotometric Dual Wavelength (450/630 nm)

Negative = $OD_{450/630} < 0.100$
 Positive = $OD_{450/630} \geq 0.100$

Extremely strong positive reaction may yield a purple precipitate within a few minutes of stopping the reaction.

A positive result indicates the presence of *C. difficile* toxin A and/or B. A negative result indicates the absence of toxins A and B, or that the level of toxin is below that which can be detected by the assay. The magnitude of the OD, above the cut-off, is not indicative of the severity or extent of the *C. difficile* infection.

QUALITY CONTROL

- The Positive and Negative Controls must be used with each batch of specimens to provide quality assurance of the reagents and the procedure. It is suggested that the results of each quality control check be recorded in an appropriate log book to maintain high quality testing procedures and compliance with regulatory agencies.
- The Negative Control should read < 0.150 at 450 nm and < 0.100 at 450/630 nm but greater than 0.00. If control is < 0.00 , re-blank the plate reader to air and reread the plate.
- The Negative Control should be colorless to faint (barely visible) yellow when read visually.
- The Positive Control should read < 2.999 but > 0.600 at either 450 nm or 450/630 nm. The Positive Control should have a definite yellow color when read visually.
- If the expected control reactions are not observed, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
- Any positive well without visible color should be repositioned, wiped on the underside of the well and reread.
- At the time of each use, kit components should be visually examined for obvious signs of microbial contamination, freezing, or leakage.

EXPECTED VALUES

The frequency of antibiotic-associated diarrhea caused by *C. difficile* is dependent on several factors including: patient population, type of institution and epidemiology. The reported incidence of *C. difficile*-associated disease in patients suspected of having antibiotic-associated diarrhea is 15-25%¹ although different facilities may find positivity rates outside this range.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- Premier Toxins A&B detects the presence of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B in stool. Failure to detect toxin A or toxin B in stool from patients with suspected *C. difficile*-associated disease may not preclude actual disease but may be due to such factors as improper collection, handling and storage of the specimen or toxin concentrations in stool below the detection limit of this kit. The Premier Toxins A&B kit will detect toxin A at levels ≥ 1.4 ng/mL stool and toxin B at levels ≥ 2.4 ng/mL stool. Reactivity of positive samples as determined by Premier Toxins A&B may decrease with time due to degradation of the toxins. As with any diagnostic test, the results of Premier Toxins A&B should be interpreted with respect to patient history and other clinical and laboratory findings.
- The performance of this assay has not been evaluated in a pediatric population.¹⁴
- Certain strains of *C. sordellii* produce toxins which are immunologically crossreactive with *C. difficile* toxins A and B. *C. sordellii* has not been isolated, however, from stool obtained from patients with antibiotic-associated diarrhea or pseudomembranous colitis while *C. difficile* was found to be present.^{15,16}
- While relatively stable at 2-8 C, *C. difficile* toxins -- particularly at low concentrations -- easily degrade at room temperatures. The rate at which the toxins degrade differs from patient sample to patient sample and therefore the rate cannot be predicted. For this reason, best practice requires that samples be refrigerated or frozen within two hours of collection and the samples tested within the timeframes recommended in this insert. Do not accept samples that have not been collected, handled or transported properly.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance of Premier Toxins A&B was evaluated in a clinical study performed at two sites in the United States. The kit was compared to the cellular cytotoxicity assay and discrepant results were resolved using toxigenic culture and a competitor's EIA for toxins A and B.

Premier Toxins A&B Results	Cytotoxin Result: Site 1		Cytotoxin Result: Site 2		Cytotoxin Result: All Sites	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Pos	55	7	35	6	90	13
Neg	3	257	2	208	5	465
Performance Statistic	Value	95% CI	Value	95% CI	Value	95% CI
Sensitivity	94.8%	85.6-98.9%	94.6%	81.8-99.3%	94.7%	88.1-98.3%
Specificity	97.3%	94.6-98.9%	97.2%	94.0-99.0%	97.3%	95.4-98.5%
Positive Predictive Value	88.7%	78.1-95.3%	85.4%	70.8-94.4%	87.4%	81.0-93.8%
Negative Predictive Value	98.8%	96.7-99.8%	99.0%	96.6-99.9%	98.9%	97.5-99.7%
Correlation	96.9%	94.4-98.5%	96.8%	93.8-98.6%	96.9%	95.1-98.1%

Performance of the Premier Toxins A&B EIA was equivalent at each of the clinical trial sites. Overall sensitivity and specificity compared to the reference cytotoxin method were 94.7% and 97.3% respectively. Examination of the 13 false-positive specimens revealed that one was positive by toxigenic culture (ie, yielded a *C. difficile* isolate producing both toxins A and B). Four other specimens were positive by a competitor's toxin A+B EIA. Thus, 5/13 (38%) of the false-positive specimens had additional independent evidence supporting the presence of toxigenic *C. difficile*. Toxigenic culture was negative on 3/5 of the Premier Toxins A&B negative, cytotoxin positive specimens. In addition, all five were negative by a competitor's toxin A+B EIA.

A competitor's A+B EIA (Wampole™ Laboratories) was also run on at each trial site. Results are compared to cytotoxin and Premier Toxins A&B below:

Premier Toxins A&B Results	Wampole A/B EIA		Wampole Toxins A/B Results	Cytotoxin Result	
	Pos	Neg		Pos	Neg
Pos	92	11	Pos	88	13
Neg	9	461	Neg	7	465
Relative Performance	Value	95% CI	Performance Statistic	Value	95% CI
Co-Positivity	91.1%	93.8-95.8%	Sensitivity	92.6%	84.5-97.0%
Co-Negativity	97.7%	95.6-98.7%	Specificity	97.3%	95.4-98.5%
Agreement	96.5%	94.5-97.7%	Positive Predictive Value	87.1%	80.6-93.7%
			Negative Predictive Value	98.5%	97.0-99.4%
			Correlation	96.5%	94.7-97.9%

Agreement between the two EIA's for toxins A&B was 96.5%. Two of the 11 specimens positive by Premier Toxins A&B and negative by the competitor's EIA were positive by cytotoxin and another specimen was positive by toxigenic culture. None of the 9 specimens positive by the competitor's EIA and negative by Premier Toxins A&B were positive by cytotoxin.

Wampole™ is a trademark of Wampole Laboratories

REPRODUCIBILITY

The reproducibility of the Premier Toxins A&B test was established using negative, low, medium and strong positive samples and controls tested in triplicate in three different batches at three sites. Inter- and intra-assay variances were calculated and are given below.

Source of Variance	Positive Control	Negative Control	High Positive	Medium Positive	Low Positive	Negative
Mean Absorbance	2.010	0.013	2.250	1.146	0.280	0.009
Within Run CV	4.1%	24.5%	7.3%	6.9%	15.9%	28.9%
Between Run CV	7.0%	16.2%	6.2%	13.9%	14.6%	31.7%

INTERFERING SUBSTANCES

Results of Premier Toxins A&B testing are not affected by blood, barium sulfate, metronidazole or vancomycin present in stool specimens.¹³

The following substances were found to have no effect on results when present in stool samples at the concentrations indicated: Barium Sulfate (stool sample diluted 1:2 with 10% Barium Sulfate), Metronidazole (2.8 µg/well), Vancomycin (2.8 µg/well), and Whole blood (50%).

ASSAY SPECIFICITY

The specificity of Premier Toxins A&B was tested by utilizing the following bacterial or viral strains. Positive and negative stools were spiked with $\geq 1 \times 10^8$ bacteria/mL and tested by Premier Toxins A&B. The only non-*C. difficile* microorganisms reactive with the Premier Toxins A&B were two strains of *Clostridium sordellii*, ATCC 9714 and VPI 9048. Both of these strains produce toxin A and B homologues HT and LT respectively. All other organisms were found to be negative when spiked into the negative stool. In addition, they did not interfere with the positive specimen.¹³

Microorganism or virus (# strains tested)

Adenovirus 40 & 41 (2)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	<i>Bacillus cereus</i> (1)
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	<i>Campylobacter coli</i> (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Clostridium butyricum</i> (1)
<i>Clostridium difficile</i> non-tox. (7)	<i>Clostridium haemolyticum</i> (1)	<i>Clostridium histolyticum</i> (1)
<i>Clostridium novyi</i> (1)	<i>Clostridium perfringens</i> (1)	<i>Clostridium septicum</i> (1)
<i>Clostridium sporogenes</i> (1)	<i>Clostridium tetani</i> (1)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	<i>Escherichia coli</i> (3)	<i>Helicobacter pylori</i> (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1)	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> (1)
<i>Proteus vulgaris</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	Rotavirus (1)
<i>Salmonella typhimurium</i> (1)	<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
<i>Shigella flexneri</i> (1)	<i>Shigella sonnei</i> (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> (1)
<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan I) (1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1)	<i>Streptococcus faecalis</i> (1)
<i>Vibrio cholerae</i> (1)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)

The Premier Toxins A&B test was also evaluated using several reference strains of *C. difficile*. Strains were grown in BHI broth for 48 hours and tested for reactivity with the Premier Toxins A&B test. Results summarized below, indicated that the test correctly identified all toxigenic strains of *C. difficile*, even those producing only toxin B. No cross-reactivity was observed with non-toxigenic strains of *C. difficile*.

<i>C. difficile</i> Type	# of Premier Toxins A&B Pos / Total (% Correct)
A+ / B+	25/25 (100%)
A- / B+	3/3 (100%)
A- / B-	0/14 (100%)

ITALIANO

PREMIER™ TOXINS A & B

REF Numero di catalogo 616096

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

Test immunoenzimatico per la ricerca delle Tossine A e B di *Clostridium difficile* nei campioni fecali

FINALITÀ D'USO

Premier Toxins A&B è un test immunoenzimatico qualitativo per la ricerca delle tossine A e B di *Clostridium difficile* nelle feci di pazienti con diarrea causata da antibiotici. Premier Toxins A&B è da utilizzarsi come aiuto nella diagnosi di malattie associate a *C. difficile* (CDAD).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Clostridium difficile produttore di tossine è considerato il più importante agente causale di diarrea associata ad antibiotici, colite¹ e colite pseudomembranosa.^{2,3} Sebbene circa il 2% degli adulti sani siano colonizzati da *C. difficile*,⁴ tuttavia molti pazienti acquisiscono questo organismo attraverso infezioni ospedaliere.⁵ Si ritiene che il trattamento con antibiotici consenta la proliferazione di *C. difficile* tossinogenico, causando una diminuzione della normale flora batterica intestinale.⁶ Due tossine, la Tossina A e la Tossina B, sono associate alla patologia causata da *C. difficile*.⁷ Queste tossine sono diverse dal punto di vista immunologico e biochimico. Antiseri preparati contro una delle due tossine purificate non cross-reagiscono con l'altra tossina.⁸ La tossina A è un'enterotossina e causa un aumento della permeabilità intestinale con conseguente accumulo di fluidi a livello enterico e diarrea.⁹ La tossina B è una potente citotossina che provoca l'arrottonamento di cellule in cultura.^{7,10} Nel criceto, la tossina B è letale se somministrata per via endovenosa da sola, o per via gastrica in combinazione con dosi subletali di tossina A.¹¹ Il contributo della tossina B nello sviluppo della malattia a livello gastrico non è ancora conosciuto. È stato comunque ipotizzato che le due proteine possano agire sinergicamente *in vivo*.^{11,12}

Il test più frequentemente utilizzato per la diagnosi di colite causata da *C. difficile* consiste nella determinazione della tossina B nelle feci dei pazienti mediante coltura cellulare e neutralizzazione della tossina con uno specifico antisiero. Sebbene questo metodo sia estremamente sensibile e la presenza di tossina B abbia una correlazione del 90-100% con la severità dell'infezione,^{1,7} tuttavia richiede strumentazione per colture cellulari e tempi di incubazione fino a 72 ore. Inoltre il test di citotossicità non è stato standardizzato, le procedure e le linee cellulari utilizzate variano notevolmente.⁹

PRINCIPI BIOLOGICI

Premier Toxins A&B è un test immunoenzimatico per la ricerca diretta delle tossine A e B di *Clostridium difficile* in campioni di feci. I pozzetti microtiter sono coattati con anticorpi monoclonali e policlonali specifici per le tossine. A tali pozzetti vengono aggiunti il campione di feci diluito e anticorpi policlonali anti-tossina A e B coniugati con perossidasi di rafano. Se le tossine sono presenti nel campione di feci diluito, gli anticorpi policlonali specifici formeranno un complesso con le tossine che rimarrà presente in seguito ai lavaggi. Dopo un lavaggio finale viene aggiunto ai pozzetti un substrato/cromogeno (perossido e tetrametilbenzidina). In presenza del complesso tossina-coniugato il substrato/cromogeno diventa di colore blu. Per aggiunta di acido (Soluzione d'arresto I) il colore vira al giallo.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

- Premier Toxins A&B Pozzetti coattati con anticorpi** – Pozzetti microtiter di plastica frazionabili singolarmente coattati con anticorpi monoclonali anti-tossina A e anticorpi policlonali da capra anti-tossina B.
- Premier Toxins A&B Controllo Positivo** - Tossine A e B inattivate in soluzione proteica tamponata contenente gentamicina e thimerosal (0,02%) come conservanti.
- Premier Toxins A&B Diluente del Campione/Controllo Negativo** - Soluzione proteica tamponata contenente gentamicina e thimerosal (0,02%) come conservanti.
- Premier Tampone di lavaggio II (20X)** - Soluzione tampone concentrata, contenente thimerosal (0,2%) come conservante.
- Premier Toxins A&B Coniugato Enzimatico** - Anticorpi policlonali da capra anti-tossina A e tossina B, marcati con perossidasi di rafano in soluzione proteica tamponata contenente gentamicina e thimerosal (0,02%) come conservanti.
- Premier Substrato I** - Soluzione tampone contenente perossido e tetrametilbenzidina.
- Premier Soluzione di arresto I** - Acido fosforico 1M.
ATTENZIONE: evitare il contatto con la pelle. Risciacquare con acqua se si verifica contatto.
- Pipette monouso**
- Fogli di pellicola adesiva per sigillare i pozzetti**
Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

MATERIALI NON FORNITI

- Provette per la diluizione dei campioni
- Acqua distillata o deionizzata
- OPZIONALE: Lettore per micropiastre EIA dotato di filtri per la lettura a 450 nm oppure a 450/630 nm*

4. Spruzzetta per i lavaggi
 5. Pipettes e cilindro graduato per preparare la soluzione di lavaggio diluita (1X)
 6. Bastoncini di legno
 7. Carta assorbente
 8. Termostato a 37 ± 2 C
 9. Timer
 10. Vortex
 11. Contenitore per scarti con disinfettante (es. soluzione di candeggina al 10%)
 12. Guanti usa-e-getta
 13. OPZIONALE: Centrifuga
 14. OPZIONALE: Agitatore termostato Stat Fax™-2200*, da utilizzare per ridurre il tempo di incubazione a 20 minuti*
 15. OPZIONALE: Lavatore di piastre semi-automatico*
- * è responsabilità dell'utilizzatore validare il lavatore di piastre semi-automatico, gli incubatori ed i lettori, prima di effettuare il test.

*Stat Fax™ è un marchio registrato della Awareness Technology, Inc.

PRECAUZIONI

1. I reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. I reagenti del kit devono essere portati a temperatura ambiente (21-27 C) e mescolati con delicatezza prima dell'uso.
3. Non portare alla bocca provette campioni o reagenti. Evitare il contatto con piccole abrasioni della pelle o con tessuti mucosi.
4. Non fumare, mangiare o bere nelle zone dove si trattano campioni o reagenti.
5. Indossare guanti usa-e-getta quando si maneggiano campioni e lavarsi le mani al termine delle analisi.
6. Non scambiare pozzetti, Coniugato Enzimatico, Substrato I e Controllo Positivo tra lotti differenti (Il Diluente del Campione/Controllo Negativo, il Tampone di Lavaggio II (20X) e la Soluzione di Arresto I sono intercambiabili tra lotti differenti purché siano utilizzati entro la data di scadenza specifica).
7. Non usare il kit dopo la data di scadenza.
8. La Soluzione d'arresto I contiene acido fosforico 1M. Se si verifica un contatto con la pelle o tessuti mucosi lavarsi immediatamente con acqua.
9. I campioni dei pazienti possono contenere agenti infettivi pertanto devono essere maneggiati come stabilito nel Manuale di Biosicurezza CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2007, secondo il Biosafety Level 2.
10. Evitare spruzzi o la formazione di aerosol quando si trattano, diluiscono o trasferiscono campioni.
11. Evitare la contaminazione batterica dei reagenti in quanto si potrebbero ottenere risultati errati.
12. Utilizzare le pipette fornite per la preparazione del campione e il trasferimento. Usare una pipetta per ogni campione. La cross-contaminazione di campioni o reagenti potrebbe causare risultati errati.
13. **Tutti i campioni di feci, indipendentemente dalla consistenza, devono essere ben mescolati prima della diluizione per garantire che venga dispensato un campione di feci rappresentativo.**
14. La concentrazione dei reagenti, i tempi e le temperature di incubazione sono stati ottimizzati per ottenere la massima sensibilità e specificità. Risultati corretti vengono ottenuti seguendo fedelmente le specifiche del kit.
15. Il Controllo Positivo contiene Tossina A e Tossina B, inattivate. Comunque deve essere trattato come potenzialmente pericoloso.
16. Mantenere i flaconi in posizione verticale per assicurare che venga dispensato un corretto volume di reattivo.
17. Evitare che durante la dispensazione dei reagenti i flaconi vengano a contatto con i pozzetti.
18. Richiudere i flaconi correttamente con gli appropriati tappi colorati.
19. Tutti i reagenti forniti sono pronti all'uso alla concentrazione appropriata (ad eccezione del Tampone di lavaggio II (20X)). Non diluire i reagenti ulteriormente.
20. Ogni deviazione dai tempi di incubazione indicati può far variare i valori di sensibilità e specificità e quindi dovrebbe essere evitata.
21. Non utilizzare le strisce dei pozzetti se la busta di alluminio appare danneggiata (se contiene ad esempio segni e fori).

FRASI DI RISCHIO E CONSIGLI DI PRUDENZA

TAMPONE DI LAVAGGIO II (20X): contiene THIMEROSAL - NOCIVO

FRASI DI RISCHIO

20/21/22 Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione
33 Pericolo di effetti cumulative

CONSIGLI DI PRUDENZA

36/37 Usare indumenti e guanti protettivi adatti

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

1. Conservare i reagenti del kit a 2-8 C. Riporli immediatamente nel frigorifero dopo l'uso.
2. Tenere i pozzetti nella loro busta fino a quando essa raggiunge la temperatura ambiente per evitare formazione di condensa. Riporre tutti i pozzetti non usati nella loro busta originale e sigillare bene.
3. Il Tampone di lavaggio II diluito può essere conservato a temperatura ambiente fino ad tre mesi.

TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

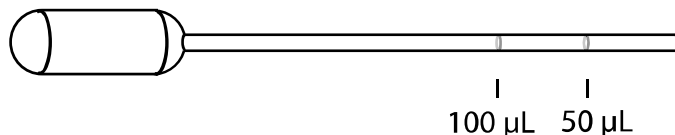
I campioni di feci devono essere raccolti in contenitori ermetici senza conservanti. Tutti i campioni devono essere conservati a 2-8 C ed analizzati il più velocemente possibile. Preferibilmente i campioni di feci devono essere analizzati entro 24 ore, ma possono essere conservati a 2-8 C fino a 72 ore. Se non fosse possibile eseguire l'analisi entro 72 ore, i campioni devono essere congelati a -20 C o a temperature inferiori, **immediatamente al ricevimento**. Un singolo ciclo di congelamento e scongelamento non altera i risultati. Non si consiglia il congelamento e lo scongelamento ripetuti dei campioni.¹³ Per diluire i campioni utilizzare solo il diluente del campione fornito con il kit. Il campione diluito può essere conservato nel diluente del campione in una provetta chiusa con il tappo (come descritto nella sezione **PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**) fino a 8 ore a 2-8 C.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti e i pozzetti a temperatura ambiente (21-27 C), immediatamente dopo l'uso riportare tutti i reagenti alla temperatura di 2-8 C.
2. Preparare il contenitore di decontaminazione per lo scarto dei reagenti e materiali.
3. Non lasciare asciugare i pozzetti tra una fase e l'altra.
4. La riproducibilità in qualunque test EIA dipende principalmente dalla modalità con cui i pozzetti sono lavati. Si raccomanda di seguire con attenzione le sequenze di lavaggio come indicato nella procedura del test. E' possibile usare un lavatore automatico.
5. Preparare il tampone di lavaggio 1X. Per esempio 5,0 mL di tampone di lavaggio II (20X) + 95,0 mL di acqua distillata o deionizzata sono sufficienti per lavare una striscia di pozzetti. Mettere il tampone in una spruzzetta pulita. Il tampone di lavaggio 1X può essere conservato a 21-27 C fino a 3 mesi.
6. Per ciascuna analisi devono essere inclusi un Controllo Positivo ed un Controllo Negativo. Usare il Controllo Positivo come indicato. **NON DILUIRE.**
7. Usare i fogli di plastica adesiva per coprire le micropiastre durante le fasi di incubazione. Tagliare la quantità necessaria e staccare la carta prima dell'uso.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE (diluizione 1:5 del campione)

1. Aspirare 200 µL di Diluente del campione e dispensare nelle provette di diluizione pulite.
2. **Mescolare bene le feci.**
 - a. **Feci liquide o semisolide:** Usando le pipette di trasferimento usa-e-getta e aspirando il campione fino alla prima tacca di graduazione (50 µL), trasferire 50 µL di feci nella provetta di diluizione contenente il Diluente Del Campione. Aspirare ed espellere le feci in sospensione con la pipetta parecchie volte. Rimuovere la pipetta e passare al vortex (15 secondi) la sospensione, lasciare la pipetta nella provetta.
 - b. **Feci solide:** Usando un bastoncino di legno, trasferire una piccola porzione di feci (3-4 mm di diametro) nella provetta di diluizione contenente il Diluente del campione. Emulsionare le feci accuratamente usando il bastoncino, quindi passare al vortex per 15 secondi. Porre nella provetta una delle pipette fornite. Procedere con il test.
3. Dopo la diluizione, i campioni di feci possono essere centrifugati. Centrifugare approssimativamente a 2750 x G per 5 minuti o fino a quando la fase solida si separa da quella liquida. Procedere con il test dopo aver recuperato il sovranatante.



PROCEDURA DEL TEST

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

NOTA: Se si esegue il test su un numero elevato di campioni è possibile facilitare alcune operazioni di distribuzione dei reagenti utilizzando una pipetta multicanale o un pipettatore ripetitivo.

1. Dopo che la busta di alluminio ha raggiunto la temperatura di 21-27 C, prelevare il numero di pozzetti necessari spezzando le strip (per ogni seduta servono 1 pozzetto per ogni campione più 1 pozzetto per il Controllo Negativo ed 1 per il Controllo Positivo). Posizionare i pozzetti nel supporto porta strip e registrare le posizioni dei campioni. I pozzetti non utilizzati devono essere riposti immediatamente nella busta e la busta richiusa (vedi Sezione **STABILITÀ E CONSERVAZIONE**).
2. Usando la stessa pipetta monouso lasciata nella provetta, prelevare 100 µL della sospensione fecale diluita (seconda tacca dalla punta della pipetta) ed aggiungerli al corrispondente pozzetto (introdurre il puntale della pipette fino a metà circa della profondità del pozzetto e indirizzare il flusso di liquido verso le pareti dello stesso).
3. Aggiungere 2 gocce di Controllo Positivo al pozzetto corrispondente. Aggiungere 100 µL (seconda tacca della pipetta di trasferimento) di Controllo Negativo (diluente del campione) al pozzetto corrispondente.
4. Distribuire 1 goccia di Coniugato enzimatico (50 µL) in ciascun pozzetto. Mescolare bene, agitando delicatamente la piastra per 30 secondi.
5. Tagliare una porzione di plastica adesiva adatta al numero di pozzetti e sigillarli accuratamente. Incubare la piastra per 50 minuti a 35-39 C. **I laboratori in possesso di un agitatore termostato (Stat Fax™-2200) possono ridurre il tempo di incubazione a 20 minuti mantenendo la piastra in agitazione a 1000 rpm e alla temperatura di 37 C.**
6. **Con attenzione** togliere la pellicola adesiva e lavare i pozzetti (vedi Sezione **PREPARAZIONE DEI REAGENTI**):
 - a. Capovolgere i pozzetti, eliminando il contenuto in un contenitore con disinfettante.
 - b. Scuotere vigorosamente la piastra capovolta su carta assorbente pulita.

- c. Riempire i pozzetti con soluzione di lavaggio diluita 1X (circa 300 µL) evitando di fare schiuma. Procedere immediatamente con il punto 6.d.
OPZIONALE: In alternativa è possibile utilizzare un lavatore di piastre semi-automatico. Selezionare un programma adatto in accordo con le istruzioni fornite dal produttore dello strumento. Al termine della procedura di lavaggio automatizzata, procedere al punto 7.
- d. Ripetere questa operazione di lavaggio (svuotare, scuotere e riempire con soluzione di lavaggio) da 4 a 6 volte (per un totale di 5-7 lavaggi). Dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere la piastra e scuotere vigorosamente su carta assorbente in modo da eliminare ogni traccia di soluzione di lavaggio, ma evitare in ogni modo che i pozzetti si asciughino.
- Pulire il fondo esterno dei pozzetti con un tovagliolo di carta.
 - Distribuire 2 gocce di Substrato I (100 µL) in ciascun pozzetto.
 - Mescolare agitando delicatamente. Incubare per 10 minuti a 21-27°C.
 - Aggiungere 2 gocce di Soluzione di arresto I (100 µL) a ciascun pozzetto. Mescolare agitando delicatamente. Dopo aver aggiunto la Soluzione di arresto I attendere 2 minuti prima di leggere il risultato (punto 11). **NOTA:** Lo sviluppo di colore della reazione positiva è blu, tale colore vira al giallo dopo aggiunta della Soluzione di arresto I.
 - Osservare la reazione:
 - Letture visiva - Leggere il risultato entro 15 minuti dall'aggiunta della Soluzione di arresto I.
 - Letture spettrofotometrica - Azzerare il lettore EIA contro aria. Pulire il fondo esterno dei pozzetti con un tovagliolo di carta. Leggere l'assorbanza a 450 nm oppure a 450/630 nm entro 30 minuti dall'aggiunta della Soluzione di arresto I.

INTERPRETAZIONE DI RISULTATI

- Letture visiva**
 Negativo = Incolore o giallo molto debole
 Positivo = Giallo ben definito
- Letture spettrofotometrica a singola lunghezza d'onda (450 nm)**
 Negativo = $OD_{450} < 0,150$
 Positivo = $OD_{450} \geq 0,150$
- Letture spettrofotometrica a doppia lunghezza d'onda (450/630 nm)**
 Negativo = $OD_{450/630} < 0,100$
 Positivo = $OD_{450/630} \geq 0,100$

Reazioni positive molto forti possono dare un precipitato color porpora entro pochi minuti dall'aggiunta della Soluzione di arresto I.

Un risultato positivo indica la presenza di Tossina A e/o Tossina B di *C. difficile*. Un risultato negativo indica l'assenza delle tossine A e B di *C. difficile* oppure che il contenuto di tossine nel campione è al di sotto del limite di rilevazione del metodo. Il valore di OD, seppur al di sopra del valore cut-off, non è proporzionale alla severità della patologia causata da *C. difficile*.

CONTROLLO DI QUALITÀ

- Il Controllo Positivo e Negativo devono essere inclusi ogni volta che si esegue il test per controllare il corretto funzionamento dei reagenti. Si consiglia di trascrivere i risultati di ciascun controllo di qualità in un apposito registro, per mantenere un elevato standard qualitativo e per ottemperare alle norme degli Enti preposti ai controlli.
- Il valore di assorbanza del Controllo Negativo deve essere $< 0,150$ a 450 nm oppure $< 0,100$ a 450/630 nm, ma $> 0,00$. Se l'assorbanza del Controllo Negativo è 0,00, riazzere il lettore e ripetere la lettura.
- Il Controllo Negativo deve risultare incolore o debolmente giallo alla lettura visiva.
- Il valore di assorbanza del Controllo Positivo deve essere $< 2,999$ ma $> 0,600$ sia a 450 nm sia a 450/630 nm. In caso di lettura visiva, il Controllo Positivo deve mostrare un colore giallo ben definito.
- Qualora si ottengano risultati diversi da quelli previsti, si consiglia di ripetere i controlli. Qualora i controlli falliscano ripetutamente, contattare il Servizio Clienti Meridian o il Distributore Locale.
- Qualora si ottenga un risultato positivo senza sviluppo di colore nel pozzetto è necessario riposizionare il pozzetto, pulire il fondo esterno e rileggere.
- Ogni volta che si usa il kit bisognerebbe esaminare ciascun flacone di reagenti per verificare che non presenti segni evidenti di contaminazione microbiologica, di congelamento o di perdite.

VALORI ATTESI

La frequenza della diarrea associata ad antibiotici causata da *C. difficile* dipende da diversi fattori che comprendono: tipo di popolazione studiata, tipo di istituzione ospedaliera e caratteristiche epidemiologiche. L'incidenza di infezione da *C. difficile* riportata nei pazienti con sospetta diarrea associata ad antibiotici è il 15-25%,¹ sebbene possano essere possibili tassi di positività diversi da questo valore.

LIMITAZIONI DELLA METODICA

- Il test Premier Toxins A&B rileva la presenza di tossina A e B di *C. difficile* nei campioni fecali. La mancata rilevazione delle tossine A e B nelle feci di pazienti con una sospetta patologia associata a *C. difficile* potrebbe non precludere la presenza dell'infezione ma essere causata da fattori quali un prelievo, trattamento o conservazione inadeguati del campione o una concentrazione di tossine inferiore ai limiti di rilevazione del kit. Il test Premier Toxins A&B rileva livelli di tossina A $\geq 1,4$ ng/mL di feci e livelli di tossina B $\geq 2,4$ ng/mL di feci. La reattività di campioni positivi determinata con il kit Premier Toxins A&B può diminuire nel tempo a causa di degradazione delle tossine. Come per ogni test diagnostico, i risultati del kit Premier Toxins A&B devono essere interpretati tenendo conto della storia del paziente e di altri dati clinici e di laboratorio.
- Le caratteristiche del test non sono state valutate per la popolazione pediatrica.¹⁴
- Alcuni ceppi di *C. sordellii* producono tossine che sono immunologicamente cross-reattive con le tossine A e B di *C. difficile*. *C. sordellii* non è stato tuttavia isolato dalle feci di pazienti con diarrea causata da antibiotici o con colite pseudomembranosa, mentre era invece presente *C. difficile*.^{15,16}
- Ché relativamente stabili a 2-8°C, le tossine di *C. difficile* – soprattutto se in bassa concentrazione – si degradano facilmente a temperatura ambiente. La velocità alla quale le tossine si deteriorano varia da campione a campione e perciò non è possibile effettuare previsioni. Per tale ragione, la procedura migliore consiste nel refrigerare o congelare le feci entro due ore dalla raccolta ed effettuare il test nei tempi indicati in queste istruzioni. Si suggerisce di non accettare campioni che non siano stati raccolti, manipolati o trasportati in modo appropriato.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Il test Premier Toxins A&B è stato valutato presso due importanti laboratori ospedalieri negli Stati Uniti. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli del test di citotossicità e i risultati discrepanti sono stati risolti mediante esame colturale e isolamento di ceppi tossinogenici e mediante un test EIA commerciale per la ricerca di tossine A e B.

Risultati del test Premier Toxins A&B	Risultati del test di citotossicità: Laboratorio 1		Risultati del test di citotossicità: Laboratorio 2		Risultati del test di citotossicità: Tutti i Laboratori	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Pos	55	7	35	6	90	13
Neg	3	257	2	208	5	465
Analisi Statistica	Valore	95% CI	Valore	95% CI	Valore	95% CI
Sensibilità	94,8%	85,6-98,9%	94,6%	81,8-99,3%	94,7%	88,1-98,3%
Specificità	97,3%	94,6-98,9%	97,2%	94,0-99,0%	97,3%	95,4-98,5%
Valore Predittivo Positivo	88,7%	78,1-95,3%	85,4%	70,8-94,4%	87,4%	81,0-93,8%
Valore Predittivo Negativo	98,8%	96,7-99,8%	99,0%	96,6-99,9%	98,9%	97,5-99,7%
Correlazione	96,9%	94,4-98,5%	96,8%	93,8-98,6%	96,9%	95,1-98,1%

In entrambi i laboratori sono stati ottenuti risultati equivalenti con il test Premier Toxins A&B. Sensibilità e Specificità in confronto con il test di citotossicità (test di riferimento) sono state rispettivamente 94,7% e 97,3%. L'esame di 13 campioni falsamente positivi ha rivelato che uno di questi era positivo mediante l'isolamento di ceppi tossinogenici (il ceppo di *C. difficile* isolato produceva entrambe le tossine A e B). Altri quattro campioni erano positivi mediante il test commerciale EIA per la ricerca delle tossine A e B. Quindi 5/13 (38%) dei campioni falsamente positivi hanno avuto un ulteriore conferma della presenza di *C. difficile* tossinogenico. L'isolamento di ceppi tossinogenici ha dato risultati negativi per tre dei cinque campioni negativi al test Premier Toxins A&B e positivi al test di citotossicità. Inoltre tutti e cinque i campioni erano negativi con il test commerciale EIA per la ricerca delle tossine A e B.

Un test EIA commerciale per le tossine A+B (Wampole™ Laboratories) è stato eseguito in entrambi i laboratori. I risultati sono stati confrontati con il test di citotossicità e con il test Premier Toxins A&B, come mostrato nella tabella sottostante:

Risultati del test Premier Toxins A&B	Wampole A/B EIA		Risultati del test Wampole Toxins A/B	Risultati del test di Citotossicità	
	Pos	Neg		Pos	Neg
Pos	92	11	88	7	13
Neg	9	461	7	465	
Analisi Statistica	Valore	95% CI	Valore	95% CI	
Co-positività	91,1%	93,8-95,8%	92,6%	84,5-97,0%	
Co-negatività	97,7%	95,6-98,7%	97,3%	95,4-98,5%	
Correlazione	96,5%	94,5-97,7%	96,5%	94,7-97,9%	

La concordanza tra i due test EIA per le tossine A e B è 96,5%. Due degli 11 campioni positivi al test Premier Toxins A&B e negativi al test EIA della concorrenza erano positivi al test di citotossicità e un altro campione era positivo all'esame colturale. Nessuno dei 9 campioni positivi al test EIA della concorrenza e negativo al test Premier Toxins A&B era positivo al test di citotossicità.

Wampole™ è un marchio registrato della Wampole Laboratories

RIPRODUCIBILITÀ

La riproducibilità del test Premier Toxins A&B è stata stabilita usando campioni negativi, bassi, medi e alti positivi e i controlli, tutti testati in triplicato in tre differenti sedute e in tre diversi laboratori. Sono state calcolate e riportate nella tabella sottostante le variazioni inter e intra-saggio.

Campione	Controllo Positivo	Controllo Negativo	Alto Positivo	Medio Positivo	Basso Positivo	Negativo
Assorbanza Media	2,010	0,013	2,250	1,146	0,280	0,009
CV intra-saggio	4,1%	24,5%	7,3%	6,9%	15,9%	28,9%
CV inter-saggio	7,0%	16,2%	6,2%	13,9%	14,6%	31,7%

SOSTANZE CHE INTERFERISCONO CON IL TEST

I risultati del test Premier Toxins A&B non sono alterati dalla presenza nel campione fecale di sangue, solfato di bario, metronidazolo o vancomicina.¹³

Le seguenti sostanze risultano non influenzare i risultati del test, quando presenti nei campioni fecali alle concentrazioni di seguito riportate: Solfato di Bario (campioni fecali diluiti 1:2 con soluzione di Solfato di Bario al 10%), Metronidazolo (2,8 µg/per pozzetto), Vancomicina (2,8 µg/per pozzetto) e sangue intero (50%).

SPECIFICITA' DEL TEST

La specificità del test Premier Toxins A&B è stata analizzata utilizzando i seguenti ceppi batterici e virali. Campioni positivi e negativi sono stati inoculati con $\geq 1 \times 10^8$ batteri/mL e analizzati con il test Premier Toxins A&B. I soli microrganismi che hanno dimostrato di cross-reagire con il test Premier Toxins A&B sono stati due ceppi di *Clostridium sordellii*, ATCC 9714 e VPI 9048. Questi ceppi producono rispettivamente tossine HT e LT che sono omologhe alle tossine A e B. Tutti gli altri organismi hanno dato risultati negativi quando inoculati in campioni di feci negativi. Inoltre non hanno mostrato interferenza con i campioni positive.¹³

Microrganismi o virus (n° di ceppi testati)

Adenovirus 40 & 41 (2)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	<i>Bacillus cereus</i> (1)
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	<i>Campylobacter coli</i> (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Clostridium butyricum</i> (1)
<i>Clostridium difficile</i> non-tox.(7)	<i>Clostridium haemolyticum</i> (1)	<i>Clostridium histolyticum</i> (1)
<i>Clostridium novyi</i> (1)	<i>Clostridium perfringens</i> (1)	<i>Clostridium septicum</i> (1)
<i>Clostridium sporogenes</i> (1)	<i>Clostridium tetani</i> (1)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	<i>Escherichia coli</i> (3)	<i>Helicobacter pylori</i> (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1)	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> (1)
<i>Proteus vulgaris</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	Rotavirus (1)
<i>Salmonella typhimurium</i> (1)	<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
<i>Shigella flexneri</i> (1)	<i>Shigella sonnei</i> (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> (1)
<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan I) (1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1)	<i>Streptococcus faecalis</i> (1)
<i>Vibrio cholerae</i> (1)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)

Il test Premier Toxins A&B è stato anche valutato utilizzando diversi ceppi di riferimento di *C. difficile*. Tali ceppi sono stati fatti crescere in brodo BHI per 48 ore e analizzati con il test Premier Toxins A&B. I risultati riassunti nella tabella sottostante indicano che il kit ha identificato correttamente tutti i ceppi tossinogenici di *C. difficile*, anche quelli produttori di sola tossina B. Non si sono verificate cross-reazioni con ceppi di *C. difficile* non tossinogenici.

Tipo di <i>C. difficile</i>	No di Pos con Premier Toxins A&B/Totale (% Corretti)
A+ / B+	25/25 (100%)
A- / B+	3/3 (100%)
A- / B-	0/14 (100%)

FRANÇAIS

PREMIER™ TOXINS A & B

REF Référence du catalogue 616096 **IVD** Dispositif médical de diagnostic in vitro

Test immunoenzymatique pour la détection des Toxines A et B de *Clostridium difficile* dans des échantillons de selles.

BUT DE LA METHODE

Le Premier Toxins A&B est un test immunoenzymatique qualitatif pour la détection des toxines A et B de *Clostridium difficile* dans des échantillons de selles de patients présentant des diarrhées associées à un traitement aux antibiotiques. Le test Premier Toxins A&B est destiné à être utilisé comme une aide au diagnostic des affections associées à *C. difficile* (CDAD).

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le *Clostridium difficile* toxinogène est la cause majeure des diarrhées et des colites¹ associées à un traitement aux antibiotiques, et est l'agent responsable de pratiquement tous les cas de colites pseudomembraneuses.^{2,3} Bien qu'environ 2% des adultes en bonne santé soient colonisés par *C. difficile*,⁴ beaucoup de patients contractent ce microorganisme lors d'infections nosocomiales.⁵ Il semble que la plupart des traitements aux antibiotiques permettent la prolifération de la souche *C. difficile* toxinogène en perturbant la flore intestinale normale.⁶ Deux toxines, la toxine A et la toxine B, sont associées aux infections induites par *C. difficile*.⁷ Ces deux toxines sont immunochimiquement et biologiquement distinctes. L'antisérum dirigé contre les toxines purifiées A ou B ne donne aucune réaction croisée avec d'autres toxines.⁸ La toxine A a été décrite comme une entérotoxine qui entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale conduisant à une accumulation de fluide entérique, et l'apparition de diarrhées.⁹ La toxine B est une cytotoxine potentielle qui cause un arrondissement des cellules en cultures.^{7,10} Chez le hamster, la toxine B est létale lorsqu'elle est administrée seule en intraveineuse ou associée à des doses sublétales de toxine A par voie gastrique.¹¹ La participation de la toxine B dans le développement des affections de l'intestin n'est pas très bien comprise. Cependant, l'hypothèse que les deux protéines puissent agir en synergie *in vivo* a été proposée.^{11,12}

Le test le plus fréquemment utilisé pour le diagnostic des colites de *C. difficile* est la détection de la toxine B dans des échantillons de selles de patients par une méthode de culture cellulaire avec neutralisation de la toxine à l'aide d'un antisérum spécifique. Ce test est extrêmement sensible, et la présence de la toxine B a une corrélation de 90-100% chez les patients ayant de graves affections,^{1,7} cependant, il a l'inconvénient de requérir la capacité à réaliser des cultures cellulaires, et un temps d'incubation d'au moins 72 heures. De plus, le test de cytotoxicité n'est pas standardisé et, les procédures et les lignes cellulaires utilisées peuvent varier considérablement.⁹

PRINCIPE DU TEST

Le Premier Toxins A&B est un test immunoenzymatique pour la détection directe des toxines A et B de *Clostridium difficile* dans des échantillons de selles. Des micropuits sécables à l'unité sont recouverts d'anticorps polyclonal et monoclonal spécifiques des toxines. Les échantillons dilués des patients, et les anticorps polyclonaux anti-toxine A et anti-toxine B conjugués à la HRP sont ajoutés dans les micropuits. Si l'une des deux toxines est présente dans l'échantillon dilué du patient, des complexes anticorps polyclonaux anti-toxines (spécifiques des deux toxines) conjugués à la HRP - toxines se forment et restent dans les micropuits après les lavages. Après le dernier lavage, la solution substrat/chromogène (peroxyde et tétraméthylbenzidine) est ajoutée dans les micropuits. Tous les conjugués fixés transformeront le substrat/chromogène en une coloration bleue. L'addition d'un acide (solution d'arrêt (Premier Stop Solution I)) transformera la coloration bleue en jaune.

MATERIEL FOURNI

- Premier Toxins A&B Micropuits recouverts d'anticorps** - Micropuits sécables en plastique recouverts d'anticorps monoclonal de souris anti-toxine A et d'anticorps polyclonal de chèvre anti-toxine B.
- Premier Toxins A&B Contrôle positif** - Toxines A et B inactivées dans une solution protéique tamponnée contenant de la gentamicine et du thimérol (0,02%) comme conservateurs.
- Premier Toxins A&B Diluant pour d'échantillon/Contrôle négatif** - Solution protéique tamponnée contenant de la gentamicine et du thimérol (0,02%) comme conservateurs.
- Solution de lavage concentrée 20X (Premier 20X Wash Buffer II)** - Tampon de lavage concentré contenant du thimérol (0,2%) comme conservateur.
- Premier Toxins A&B Conjugué enzymatique** - Anticorps polyclonaux de chèvre anti-toxine A et anti-toxine B conjugués à la peroxydase du raifort (HRP) dans une solution protéique tamponnée contenant de la gentamicine et du thimérol (0,02%) comme conservateurs.
- Substrat (Premier Substrate I)** - Solution tamponnée contenant du peroxyde et du tétraméthylbenzidine.
- Solution d'arrêt (Premier Stop Solution I)** - Acide phosphorique 1M. **ATTENTION** : Eviter tout contact avec la peau. Rincer abondamment à l'eau en cas de contact.
- Pipettes de transferts d'échantillons**
- Film adhésif pour microplaques**

Le nombre maximum de déterminations est renseigné sur l'étiquette du coffret.

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Tubes à essai pour la dilution des échantillons
- Eau distillée ou désionisée
- En option: Lecteur de plaque ELISA pour lire l'absorbance à 450 nm ou 450/630 nm*
- Pissette
- Pipettes et éprouvettes graduées pour la dilution du tampon de lavage 1X
- Bâtonnets d'application en bois
- Papier absorbant
- Incubateur à 37 ± 2 C
- Minuteur
- Vortex
- Containeur à déchets contenant un désinfectant (comme une solution d'eau de javel à 10%) et/ou des sacs pour matériel biologique autoclavables
- Gants jetables
- En option: Centrifugeuse
- En option: Incubateur/Mélangeur Stat Fax™ - 2200 pour l'incubation de 20 minutes*
- En option: laveur semi-automatique de microplaque*

* Il est de la responsabilité de l'opérateur de valider le laveur semi-automatique, les incubateurs et lecteurs de microplaque avant utilisation de ces appareils avec ce produit.

*Stat Fax™ est une marque déposée de Awareness Technology, Inc.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Tous les réactifs sont destinés au diagnostic in vitro uniquement.
- Les réactifs du coffret doivent être ramenés à température ambiante (21-27 C) et mélangés doucement avant utilisation.
- Ne pas pipeter à la bouche les échantillons ou les réactifs. Eviter tout contact avec la peau et les muqueuses.
- Ne pas fumer, boire ou manger dans les zones de manipulation des échantillons et des réactifs.
- Utiliser des gants jetables lors de la manipulation des échantillons et bien se laver les mains ensuite.
- Ne pas mélanger les micropuits, le conjugué enzymatique, le substrat, le contrôle positif de différents lots. (Le diluant d'échantillon/contrôle négatif, la solution de lavage concentrée 20X (Premier 20X Wash Buffer II) et la solution d'arrêt (Premier Stop Solution I) sont interchangeables lorsque les réactifs de même référence n'ont pas dépassé la date d'expiration.
- Ne pas utiliser le coffret après la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.
- La Solution d'arrêt (Premier Stop Solution I) contient de l'acide phosphorique 1M. En cas de contact avec la peau ou les muqueuses, rincer immédiatement à l'eau.

- Les échantillons de patients peuvent contenir des agents infectieux et doivent être manipulés avec un niveau 2 de sécurité comme recommandé dans le CDC/NIH Manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories," 2007.
- Éviter les éclaboussures ou la formation de gouttelettes en suspension lors de la manipulation, de la dilution ou du transfert des échantillons.
- Éviter toute contamination microbienne des réactifs, qui peuvent conduire à des résultats incorrects.
- Les pipettes de transferts fournies doivent être utilisées pour la préparation et le transfert des échantillons. Utiliser une pipette par échantillon. Toute contamination croisée entre les échantillons ou les réactifs peut conduire à des résultats incorrects.
- Tous les échantillons de selles doivent être mélangés avec soin, sans tenir compte de la consistance, afin d'assurer un échantillon représentatif avant le transfert.**
- La concentration des réactifs, les temps d'incubation et les températures ont été optimisés pour la sensibilité et la spécificité de ce test. Il est recommandé de suivre ces conditions pour obtenir les meilleurs résultats.
- Le contrôle positif contient des toxines A et B inactivées. Cependant, il doit être manipulé comme un matériel potentiellement infectieux.
- Tenir les flacons en position verticale pour garantir un calibrage correct du dépôt.
- Éviter que les embouts des flacons ne viennent en contact avec les micropuits.
- Replacer les bouchons colorés sur leurs flacons respectifs.
- Tous les réactifs sont fournis prêts à l'emploi excepté la solution de lavage (Premier 20X Wash Buffer II). Ne pas diluer.
- Toute modification des temps d'incubation peut affecter la sensibilité et la spécificité de ce test et doit donc être évitée.
- Ne pas utiliser les micropuits dont le sachet de conservation est endommagé (ie, ouvertures ou trous).

PHRASES DE RISQUES ET CONSEILS DE PRUDENCE

TAMPON DE LAVAGE (Premier 20X Wash Buffer II): THIMEROSAL - NOCIF

PHRASES DE RISQUES

20/21/22 Nocif par inhalation, par contact avec la peau et en cas d'ingestion
33 Danger d'effets cumulatifs

CONSEILS DE PRUDENCE

36/37 Porter un vêtement de protection et des gants appropriés

CONSERVATION DES REACTIFS

- Conserver les réactifs du coffret à une température comprise entre 2 et 8 C. Replacer les réactifs le plus rapidement possible au réfrigérateur après utilisation.
- Laisser les micropuits revenir à température ambiante dans leur emballage pour éviter toute condensation. Replacer tous les micropuits inutilisés et le dessiccant dans l'emballage d'origine et le fermer hermétiquement.
- La solution diluée du tampon de lavage peut être conservée à température ambiante et utilisée dans les trois mois qui suivent.

MANIPULATION DES PRELEVEMENTS

Collecter les prélèvements de selles dans un conteneur propre, fermé hermétiquement sans aucun conservateur. Tous les échantillons de selles doivent être conservés à une température de 2-8 C et testés le plus rapidement possible. Idéalement, les prélèvements de selles doivent être testés dans les 24 heures mais ils peuvent être conservés à une température de 2-8 C jusqu'à 72 heures. Si les prélèvements ne peuvent être testés dans les 72 heures, ils doivent être congelés dès leur réception à -20 C. Un seul cycle de congélation-décongélation n'affectera pas les résultats.¹³ Les congélations et décongélation répétées des échantillons doivent être évitées. Utiliser uniquement le Diluant d'Échantillon fourni dans ce coffret pour la dilution des prélèvements. Les prélèvements peuvent être conservés dilués dans un tube fermé avec le diluant d'échantillon (comme décrit dans "PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS" ci-dessous) 8 heures durant à 2-8 C.

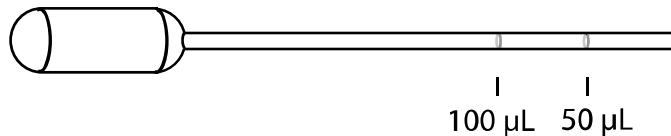
PRÉPARATION DES REACTIFS

- Amener à température ambiante (21-27 C) le coffret et les micropuits dans leur sac d'emballage avant utilisation. Replacer immédiatement le coffret à 2-8 C après utilisation.
- Préparer la vaisselle de décontamination pour l'élimination des réactifs et du matériel.
- Éviter que les micropuits se dessèchent entre les étapes.
- La reproductibilité de tout test ELISA est largement dépendante de la régularité et de la minutie des étapes de lavage des micropuits. Suivre attentivement les recommandations de la méthode de lavage décrite dans la procédure de test ELISA. Un système de lavage automatisé peut être utilisé.
- Préparer le Tampon de lavage 1X nécessaire. Par exemple: 5,0 mL de Tampon de lavage concentré (Premier 20X Wash Buffer II) + 95,0 mL d'eau distillée ou désionisée représente un volume suffisant pour effectuer le lavage d'une barrette. Placer le tampon dans une bouteille propre. Le tampon de lavage 1X peut être conservé à 21-27 C pendant 3 mois.
- Le contrôle positif et le contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle positif est prêt à l'emploi. **NE PAS DILUER.**
- Utiliser le film adhésif pour microplaques ELISA lors des étapes d'incubation. Le couper à la taille adéquate et enlever le papier avant utilisation.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS (une dilution des échantillons au 1:5)

- Ajouter 200 µL de diluant d'échantillon dans un tube à essai propre à l'aide d'un compte-gouttes (ou équivalent).

- Mélanger les selles aussi soigneusement que possible avant de pipeter.**
 - Pour des selles liquides ou semi-solides:** En utilisant une pipette de transfert jetable, aspirer les selles jusqu'au premier trait de jauge (50 µL), et transférer ce volume dans le tube contenant le diluant d'échantillon. Rincer la pipette de transfert en aspirant et refoulant la suspension de selles plusieurs fois. Retirer la pipette et mélanger la suspension de selles au vortex (15 secondes), puis replacer la pipette dans le tube pour les manipulations suivantes.
 - Pour des selles solides:** En utilisant un bâtonnet applicateur en bois, transférer une petite quantité (3-4mm de diamètre) de selles soigneusement mélangées dans le diluant d'échantillon. Emulsifier les selles à l'aide du bâtonnet applicateur en bois puis vortexer pendant 15 secondes. Placer une pipette de transfert dans le tube. Procéder immédiatement au dosage.
- Les échantillons de selles peuvent éventuellement être centrifugés après dilution, à 2750 x G pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que les phases solide et liquide se séparent. Poursuivre le dosage avec le sumageant.



PROCEDURE DU TEST

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

REMARQUE: Pour un nombre important d'échantillons, une pipette multicanaux peut être utilisée pour la distribution des réactifs.

- Après avoir amené les micropuits à température ambiante (21-27 C) dans leur emballage, détacher le nombre de micropuits nécessaires (un puits par échantillon plus un puits pour le contrôle positif et un pour le contrôle négatif par série). Placer les micropuits sur le support de barrette et noter la position de tous les puits. Placer immédiatement les puits non utilisés dans le sachet plastique refermable (voir le paragraphe "CONSERVATION DES REACTIFS").
- Pipeter, au moyen de la pipette de transfert fournie, 100 µL de selle diluée (deuxième graduation à partir de l'embout de la pipette) dans le puits correspondant. (Placer la pipette à mi-hauteur dans le puits et déposer très lentement l'échantillon dilué, le long de la paroi du puits.)
- Ajouter 2 gouttes de contrôle positif dans un puits, et 100 µL de contrôle négatif/diluant échantillon dans un puits.
- Ajouter dans chaque puits 1 goutte de conjugué enzymatique (50 µL). Bien homogénéiser la plaque par mouvement circulaire pendant 30 secondes.
- Recouvrir les barrettes à l'aide du film adhésif et laisser incubé la plaque pendant 50 minutes à 35-39 C. **Les laboratoires équipés d'un agitateur de plaque chauffant (Stat Fax™-2200) peuvent incubé et mélanger la plaque par rotation pendant 20 minutes à 37 C à 1000 rpm (protocole #5).**
- Enlever délicatement le film adhésif et procéder au lavage des micropuits (voir "PRÉPARATION DES REACTIFS"):
 - Éliminer d'un geste ferme le contenu des puits dans un récipient pour déchets biologiques.
 - Retourner la plaque et la taper sur du papier absorbant propre.
 - Remplir complètement les puits de tampon de lavage 1X. Éviter la formation de mousse dans les puits en dirigeant le flux du tampon sur la paroi du puits. Passer immédiatement à l'étape 6d.

Option: alternativement, un laveur de plaque semi-automatique peut être utilisé. Sélectionner le programme approprié suivant les instructions du fabricant. Passer à l'étape 7 lorsque le lavage automatique est terminé.

 - Répéter le cycle de lavage (vider, taper sur du papier propre, remplir) 4 à 6 fois (de manière à obtenir au total 5 à 7 lavages). Après le dernier remplissage, vider et taper la plaque suffisamment fort sur du papier absorbant propre pour éliminer l'excès de tampon de lavage, mais ne laisser à aucun moment les puits sécher complètement.
- Essuyer le dessous de la plaque à l'aide d'un tissu non pelucheux.
- Ajouter 2 gouttes (100 µL) de substrat (Premier Substrate I) dans chaque puits.
- Bien homogénéiser la plaque par mouvement circulaire pendant 10-15 secondes puis incubé pendant 10 minutes à 21-27 C.
- Ajouter 2 gouttes (100 µL) de solution d'arrêt (Premier Stop Solution I) dans chaque puits. Bien mélanger en agitant la plaque par un mouvement circulaire pendant 30 secondes. Attendre 2 minutes après l'addition de la solution d'arrêt avant de procéder à la lecture (étape 11). **REMARQUE:** La couleur initiale d'une réaction positive est bleue, mais celle-ci vire au jaune après addition de la solution d'arrêt (Premier Stop Solution I).
- Observation des réactions:
 - Détermination visuelle - Lire dans les 15 minutes après addition de la solution d'arrêt (Premier Stop Solution I).
 - Détermination par spectrophotométrie - Faire le zéro du lecteur sur l'air. Essuyer le dessous de la plaque à l'aide d'un tissu non pelucheux. Lire à 450 nm ou 450/630 nm dans les 30 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt (Premier Stop Solution I).

INTERPRÉTATION DES RESULTATS

- Lecture visuelle**
Négatif = incolore à jaune pâle (à peine visible)
Positif = coloration jaune marquée
- Lecture en spectrophotométrie à longueur d'onde simple (450 nm)**
Négatif = DO₄₅₀ < 0,150
Positif = DO₄₅₀ ≥ 0,150

3. Lecture en spectrophotométrie à double longueur d'onde (450/630 nm)

Négatif = $DO_{450/630} < 0,100$
Positif = $DO_{450/630} \geq 0,100$

Une réaction fortement positive peut donner un précipité violet dans les minutes qui suivent l'arrêt de la réaction.

Un résultat positif indique la présence des toxines A et/ou B de *C. difficile*. Un résultat négatif indique l'absence de toxines A et B, ou que le taux des toxines est inférieur à la limite du seuil de détection du test. La valeur de DO au-dessus de la valeur seuil n'est pas représentative de la sévérité ou de l'ampleur de l'infection à *C. difficile*.

CONTROLE DE QUALITE

- Les contrôles Positif et Négatif doivent être inclus dans chaque série de tests afin de garantir la qualité des réactifs et de la procédure. Il est recommandé de noter les résultats de chaque contrôle qualité dans un cahier de laboratoire afin de maintenir une qualité élevée de procédure et la conformité avec les agences réglementaires.
- Le Contrôle Négatif doit être $< 0,150$ à 450 nm et $< 0,100$ à 450/630 nm mais supérieur à 0,00. Si le contrôle est $< 0,00$, refaire le zéro sur l'air et relire la plaque.
- En lecture visuelle, le Contrôle Négatif doit être incolore ou jaune pâle.
- Le Contrôle Positif doit être $< 2,999$ mais $> 0,600$ aussi bien à 450 nm qu'à 450/630 nm. En lecture visuelle, le Contrôle Positif doit avoir une coloration jaune bien définie.
- Si les réactions attendues ne sont pas observées et que les réactifs ne sont pas périmés, la première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
- Tout puits positif ne présentant pas de couleur visible doit être essuyé sur sa face inférieure, repositionné et lu à nouveau.
- Lors de chaque utilisation, les réactifs du coffret doivent être contrôlés visuellement afin de détecter d'éventuels signes de contamination microbienne, de congélation ou de fuite.

VALEURS ATTENDUES

La fréquence des diarrhées associées aux antibiotiques causées par *C. difficile* est dépendante de plusieurs facteurs comprenant: la population du patient, le type d'institution et d'épidémiologie. L'incidence rapportée des affections associées à *C. difficile* chez des patients suspectés d'avoir des diarrhées associées aux antibiotiques est de 15-25%,¹ bien que des conditions différentes puissent donner des taux de positivité en dehors de cet intervalle.

LIMITES DE LA METHODE

- Le test Premier Toxins A&B détecte la présence des toxines A et B de *Clostridium difficile* dans des échantillons de selles. L'absence de détection de toxines A ou B dans des selles de patients suspectés d'avoir une affection associée à *C. difficile*, ne doit pas exclure la possibilité d'une affection réelle mais peut être la conséquence de facteurs tels qu'un prélèvement, une manipulation ou une conservation des échantillons incorrects ou encore d'une concentration de toxines dans les selles en dessous de la limite du seuil de détection du test. Le test Premier Toxins A&B détectera la toxine A à un taux de $\geq 1,4$ ng/mL de selles et la toxine B à un taux de $\geq 2,4$ ng/mL de selles. La réactivité des échantillons positifs déterminés à l'aide du test Premier Toxins A&B peut décroître dans le temps du fait de la dégradation des toxines. Comme avec tous les tests de diagnostic, les résultats du Test Premier Toxins A&B doivent être interprétés en tenant compte de l'histoire du patient et des autres résultats cliniques et de laboratoire.
- Aucun test de performance n'a été effectué sur une population relevant d'un service de pédiatrie.¹⁴
- Certaines souches de *C. sordellii* produisent des toxines qui sont immunologiquement réactives avec les toxines A et B de *C. difficile*. Cependant *C. sordellii* n'a encore jamais été isolé dans des selles de patients présentant des diarrhées ou des colites pseudomembraneuses associées à un traitement aux antibiotiques, où la présence de *C. difficile* a été détectée.^{15,16}
- Bien que relativement stables à 2-8°C, les toxines du *C. difficile* se dégradent aisément à température ambiante, particulièrement lorsqu'elles sont à faibles concentrations. La vitesse à laquelle les toxines se dégradent diffère d'un échantillon à l'autre. Il est donc impossible d'estimer la vitesse de dégradation. Pour cette raison, la meilleure pratique consiste à réfrigérer ou à congeler l'échantillon dans les deux heures après prélèvement, ensuite à tester les échantillons dans la période de temps recommandée dans la notice. Ne pas tester d'échantillons prélevés, manipulés ou transportés incorrectement.

PERFORMANCES DU TEST

Le test Premier Toxins A&B a été évalué lors d'une étude clinique réalisée sur deux sites aux Etats-Unis. Le test Premier a été comparé à un test de cytotoxicité cellulaire, et les résultats divergents ont été ensuite analysés en utilisant la culture toxigénique et un test ELISA pour les toxines A et B d'une société concurrente.

Résultats Premier Toxins A&B	Résultats Cytotoxine: Site 1		Résultats Cytotoxine: Site2		Résultats Cytotoxine: Cumul des 2 sites	
	Pos	Nég	Pos	Nég	Pos	Nég
Positifs	55	7	35	6	90	13
Négatifs	3	257	2	208	5	465
Statistiques de performance	Valeur	95% CI	Valeur	95% CI	Valeur	95% CI
Sensibilité	94,8%	85,6-98,9%	94,6%	81,8-99,3%	94,7%	88,1-98,3%
Spécificité	97,3%	94,6-98,9%	97,2%	94,0-99,0%	97,3%	95,4-98,5%
Valeur prédictive positive	88,7%	78,1-95,3%	85,4%	70,8-94,4%	87,4%	81,0-93,8%
Valeur prédictive négative	98,8%	96,7-99,8%	99,0%	96,6-99,9%	98,9%	97,5-99,7%
Corrélation	96,9%	94,4-98,5%	96,8%	93,8-98,6%	96,9%	95,1-98,1%

La performance du test Premier Toxins A&B a été équivalente dans chacun des sites d'essais cliniques. La sensibilité et la spécificité globales comparées à la méthode de cytotoxine de référence étaient respectivement de 94,7% et 97,3%. L'analyse des 13 échantillons faussement positifs a révélé que l'un était positif en culture toxigénique (c.a.d qui donnait un isolat produisant les toxines A et B). Quatre autres échantillons étaient positifs au test ELISA toxines A+B concurrent. Aussi, 5/13 (38%) des échantillons faussement positifs montraient des preuves additionnelles indépendantes en faveur de la présence d'une souche toxigène de *C. difficile*. La culture toxigénique était négative dans 3/5 des échantillons négatifs au test Premier Toxins A&B, et positifs à la cytotoxine. De plus, tous les cinq étaient négatifs au test ELISA toxines A+B concurrent.

Un test EIA toxines A+B concurrent (Laboratoires Wampole™*) a été également réalisé dans chacun des sites d'essais cliniques. Les résultats comparés à la cytotoxine et au test Premier Toxins A&B sont présentés ci-dessous:

Résultats Premier Toxins A&B	Wampole A/B EIA		Résultats Cytotoxine	
	Pos	Nég	Pos	Nég
Positifs	92	11	88	13
Négatifs	3	461	7	465
Statistiques de performance	Valeur	95% CI	Valeur	95% CI
Sensibilité	91,1%	93,8-95,8%	92,6%	84,5-97,0%
Spécificité	97,7%	95,6-98,7%	97,3%	95,4-98,5%
Valeur prédictive positive	97,7%	95,6-98,7%	87,1%	80,6-93,7%
Valeur prédictive négative	96,5%	94,5-97,7%	98,5%	97,0-99,4%
Corrélation			96,5%	94,7-97,9%

La corrélation entre les deux tests EIA pour les toxines A&B était de 96,5%. Deux des 11 échantillons positifs au test Premier Toxins A&B et négatifs au test EIA toxines A+B concurrent étaient positifs à la cytotoxine et un autre échantillon était positif en culture toxigénique. Aucun des 9 échantillons positifs au test EIA toxines A+B concurrent et négatif au test Premier Toxins A&B n'était positif à la cytotoxine.

*Wampole™ est une marque déposée de Wampole Laboratories

REPRODUCTIBILITE

La reproductibilité du test Premier Toxins A&B a été évaluée en utilisant des échantillons négatifs, et des échantillons faiblement, moyennement et fortement positifs ainsi que des contrôles, qui ont été testés trois fois dans trois séries différentes dans trois sites. Les variabilités inter- et intra- essais ont été calculées et sont présentées dans le tableau ci-dessous:

Sources de Variabilité	Contrôle Positif	Contrôle Négatif	Positif Fort	Positif Modéré	Positif Faible	Négatif
Absorbance moyenne	2,010	0,013	2,250	1,146	0,280	0,009
CV intra-essai	4,1%	24,5%	7,3%	6,9%	15,9%	28,9%
CV inter-essais	7,0%	16,2%	6,2%	13,9%	14,6%	31,7%

INTERFERENCES

Les résultats du test Premier Toxins A&B ne sont pas affectés par la présence de sang, de sulfate de baryum, de métronidazole ou de vancomycine dans les échantillons de selles.¹³

Aucune des substances aux concentrations reportées ci-après n'a produit de réaction croisée lorsque présente dans les échantillons de selles: sulfate de baryum (échantillon de selles dilué 1:2 à l'aide d'une solution à 10% de sulfate de baryum), métronidazole (2,8 µg/puits), vancomycine (2,8 µg/puits), et sang total (50%).

SPECIFICITE DU TEST

La spécificité du test Premier Toxins A&B a été évaluée en utilisant les souches bactériennes ou virales suivantes. Des échantillons de selles positifs et négatifs ont été testés avec une concentration $\geq 1 \times 10^5$ bactéries/mL à l'aide du test Premier Toxins A&B. Les seuls microorganismes réactifs au test Premier Toxins A&B, autres que *C. difficile*, sont les deux souches de *Clostridium sordellii*, ATCC 9714 et VPI 9048. Ces deux souches produisent des toxines homologues à A et B, qui sont respectivement HT et LT. Tous les autres microorganismes ont été trouvés négatifs lorsqu'ils étaient testés dans des échantillons de selles négatifs. De plus, ils n'interfèrent pas avec les échantillons positifs.¹³

Microorganismes ou virus (nombre de souches testées)

Adenovirus 40 & 41 (2)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	<i>Bacillus cereus</i> (1)
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	<i>Campylobacter coli</i> (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Clostridium butyricum</i> (1)
<i>Clostridium difficile</i> non-tox.(7)	<i>Clostridium haemolyticum</i> (1)	<i>Clostridium histolyticum</i> (1)
<i>Clostridium novyi</i> (1)	<i>Clostridium perfringens</i> (1)	<i>Clostridium septicum</i> (1)
<i>Clostridium sporogenes</i> (1)	<i>Clostridium tetani</i> (1)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	<i>Escherichia coli</i> (3)	<i>Helicobacter pylori</i> (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1)	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> (1)
<i>Proteus vulgaris</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	<i>Rotavirus</i> (1)
<i>Salmonella typhimurium</i> (1)	<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
<i>Shigella flexneri</i> (1)	<i>Shigella sonnei</i> (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> (1)
<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan I) (1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1)	<i>Streptococcus faecalis</i> (1)
<i>Vibrio cholerae</i> (1)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)

Le test Premier Toxins A&B a également été évalué en utilisant plusieurs souches de référence de *C. difficile*. Les souches étaient maintenues dans un bouillon BHI pendant 48 heures puis leur réactivité au test Premier Toxins A&B contrôlée. Les résultats, résumés ci-dessous, indiquent que le test identifie correctement toutes les souches toxigènes de *C. difficile*, même celles ne produisant que la toxine B. Aucune réactivité croisée n'a été observée avec les souches non toxigènes de *C. difficile*.

<i>C. difficile</i> Type	Nbre de positifs avec Premier Toxins A&B/Total (% Exactitude)
A+ / B+	25/25 (100%)
A- / B+	3/3 (100%)
A- / B-	0/14 (100%)

PREMIER™ TOXINS A & B

REF Número de catálogo 616096 IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

Immunoensayo enzimático para la detección de Toxina A y Toxina B de *Clostridium difficile* en muestras de materia fecal.

USO INDICADO

Premier Toxins A&B es un immunoensayo enzimático cualitativo para la detección de toxina A y toxina B de *Clostridium difficile* en heces de pacientes con diarrea asociada a antibióticos. Se sugiere utilizar el ensayo Premier Toxins A&B como una ayuda en el diagnóstico de enfermedad asociada a *C. difficile* (CDAD).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

Clostridium difficile toxigénico es el causante principal de la diarrea asociada a antibióticos y colitis¹ y es el agente causativo de virtualmente todos los casos de colitis pseudomembranosa.^{2,3} Aunque sobre el 2% de los adultos sanos están colonizados por *C. difficile*,⁴ muchos pacientes adquieren este microorganismo a través de infección nosocomial.⁵ Se cree que la exposición a la mayoría de antibióticos permite la proliferación de *C. difficile* toxigénico al alterarse la flora intestinal normal.⁶ Dos toxinas, toxina A y toxina B, están asociadas con la enfermedad causada por *C. difficile*.⁷ Estas toxinas son inmunológica y biológicamente distintas. Un antisuero preparado contra toxina A o toxina B purificada no reacciona cruzadamente con la otra toxina.⁸ La Toxina A ha sido descrita como una enterotoxina que causa un incremento de la permeabilidad intestinal con el subsecuente acúmulo de fluido entérico y diarrea.⁹ La Toxina B es una potente citotóxica que provoca la circularización de las células en cultivo.^{7,10} En hamsters, la toxina B es letal por sí misma si se administra vía intravenosa. También lo es vía intragástrica si va acompañada de dosis subletales de toxina A.¹¹ La contribución de la toxina B al desarrollo de la enfermedad en el intestino no es comprendida. No obstante, se hipotetiza que ambas proteínas pueden actuar sinérgicamente *in vivo*.^{11,12}

El test utilizado con más frecuencia en el diagnóstico de colitis por *C. difficile* es la determinación de la toxina B en heces de pacientes a través de cultivo celular con neutralización de la toxina por un antisuero específico. Aunque este ensayo es extremadamente sensible y la presencia de toxina B tiene una correlación positiva del 90-100% en pacientes con enfermedad severa,^{1,7} requiere la capacidad de realizar cultivo celular y hasta 72 horas de incubación. Además, el ensayo de la citotoxina no está estandarizado y las líneas celulares y los procedimientos utilizados varían considerablemente.⁹

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

Premier Toxins A&B es un immunoensayo enzimático para la detección directa de toxina A y toxina B en muestras de materia fecal. Los micropocillos separables están recubiertos con anticuerpos monoclonales y policlonales específicos de toxina. Se añaden a los micropocillos las muestras diluidas de los pacientes y los anticuerpos policlonales anti-toxina A y B conjugados con peroxidasa de rábano. Si alguna de las toxinas se encuentra presente en las muestras diluidas de los pacientes, se forman complejos de anticuerpos policlonales de toxina conjugados con la peroxidasa de rábano (específicos para ambas toxinas) que permanecen en los micropocillos después del lavado. Después del lavado final, se añade a los pocillos un sustrato/cromógeno (peóxido y tetrametilbencidina). El conjugado que reste aún unido a los pocillos convertirá el sustrato/cromógeno en un color azul. Al añadir ácido (Solución de Parada I) el color azul se convierte en amarillo.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

- Premier Toxins A&B Micropocillos recubiertos de Anticuerpo** – Pocillos plásticos separables recubiertos con anticuerpo anti-toxina A monoclonal de ratón y anticuerpo anti-toxina B policlonal de cabra.
- Premier Toxins A&B Control Positivo** – Toxina A y B inactivadas en una solución proteica tamponada que contiene gentamicina y timerosal (0,02%) como conservantes.
- Premier Toxins A&B Diluyente de Muestra/Control Negativo** – Solución proteica tamponada que contiene gentamicina y timerosal (0,02%) como conservantes.
- Premier Tampón de Lavado 20X II** – Tampón de lavado concentrado que contiene timerosal (0,2%) como conservante.
- Premier Toxins A&B Conjugado Enzimático** – Anticuerpos policlonales de cabra anti-toxina A y anti-toxina B conjugados con peroxidasa de rábano en una solución proteica tamponada y que contiene gentamicina y timerosal (0,02%) como conservantes.
- Premier Substrato I** – Solución tamponada que contiene peróxido y tetrametilbencidina.
- Premier Solución de Parada I** – Ácido Fosfórico. PRECAUCIÓN: Evite el contacto con la piel. Si el contacto ocurriera, lave la parte afectada con agua abundante.
- Pipetas de Transferencia de Muestras**
- Selladores de Tira de Micropocillos**

El número máximo de test obtenidos con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

- Tubos de ensayo para la dilución de las muestras
 - Agua destilada o desionizada
 - OPCIONAL: Lector para el ensayo inmunoensayo en micropocillos capaz de leer absorbancias a 450 nm o 450/630 nm*
 - Botella surtidora de enjuague
 - Pipetas y probeta graduada para preparar Tampón de Lavado 1X
 - Varillas aplicadoras de madera
 - Papel absorbente
 - Incubador 37 ± 2 C
 - Cronómetro
 - Agitador tipo Vortex
 - Contenedor de desechos con desinfectante (p.e. solución de lejía al 10%) y/o bolsas autoclavables para residuos biopeligrosos
 - Guantes desechables
 - OPCIONAL: Centrifugadora
 - OPCIONAL: Stat Fax™ - 2200* Incubador/Agitador para utilizar en procesos de 20 minutos de incubación*
 - OPCIONAL: Lavador de Plato Semiautomático*
- * Es la responsabilidad del operador validar el lavador de plato semiautomático, incubadora y lector antes de usarse con este producto.

*Stat Fax es una Marca Registrada de Awareness Technology, Inc.

PRECAUCIONES

- Todos los reactivos son para utilización diagnóstica in vitro solamente.
- Los reactivos del kit deberían estar a temperatura ambiente (21-27 C) y ser suavemente agitados antes de ser utilizados.
- No pipetea muestras o reactivos con la boca. Evite el contacto de los mismos con la piel o con las membranas mucosas.
- No fume, beba ni coma en las áreas donde se manipulan las muestras o los reactivos del kit.
- Use guantes desechables mientras manipule las muestras y lávese las manos vigorosamente acto seguido.
- No intercambie los micropocillos, el Conjugado, el Substrato I y el Control Positivo entre lotes. (El Diluyente de Muestra/Control Negativo, el Tampón de Lavado 20X II y la Solución de Parada I, si son intercambiables dado que los reactivos estén dentro de su fecha de caducidad al usarse).
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.
- La Solución de Parada I contiene ácido fosfórico 1M. Si ocurriera contacto con la piel o membranas mucosas, lave inmediatamente la parte afectada con agua abundante.
- Las muestras de los pacientes pueden contener agentes infecciosos y deberían ser manipuladas al nivel 2 de Bioseguridad tal como se recomienda en el manual CDC/NIH "Bioseguridad en los Laboratorios de Microbiología y Biomédicos," 2007.
- Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles cuando manipule, diluya o transfiera las muestras.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos ya que puede conllevar a resultados incorrectos.
- Las pipetas de transferencia suministradas deben ser utilizadas para la preparación y la transferencia de la muestra. Utilice una por muestra. La contaminación cruzada de muestras o reactivos puede provocar resultados incorrectos.
- Todas las muestras de materia fecal deben ser vigorosamente agitadas, sea cuál sea su consistencia, antes de ser pipeteadas para asegurar así una muestra representativa.**
- La concentración de los reactivos y los tiempos y temperaturas de incubación han sido optimizados para la sensibilidad y especificidad. Los mejores resultados se obtendrán ajustándose a esas especificaciones.
- El Control Positivo contiene toxina A y toxina B inactivadas. No obstante, debería ser manipulado como un producto potencialmente biopeligroso.
- Sostenga todos los viales de modo vertical para asegurar así un suministro y un tamaño de gota apropiados.
- No deje que la punta de ningún vial toque los micropocillos.
- Recolecte los tapones coloreados en los viales correspondientes.
- Todos los reactivos se suministran ya diluidos a la concentración apropiada (excepto el Tampón de Lavado 20X II). No los diluya más.
- Se debería evitar cualquier desviación por debajo o por encima de los tiempos de incubación indicados ya que puede afectar a la sensibilidad y especificidad.
- No use micropocillos que tengan la bolsa dañada (ej. rotos o perforados).

FRASES DE RIESGO Y SEGURIDAD

SOLUCION TAMPON DE LAVADO 20X II: THIMEROSAL - NOCIVO

FRASES DE RIESGO
20/21/22 Nocivo por inhalación, en contacto directo con la piel y por ingestión
33 Peligro de efectos acumulativos

FRASES DE SEGURIDAD

36/37 Vista ropa apropiada y guantes para protegerse

CADUCIDAD Y ALMACENAMIENTO

- Almacene todos los reactivos del kit a 2-8 C. Retorne con prontitud el kit al refrigerador una vez utilizado.
- Mantenga los micropocillos en su bolsa hasta que ésta alcance la temperatura ambiente para así evitar condensación. Recolecte todos los micropocillos no utilizados y el desecante dentro de la bolsa y ciérrela herméticamente.
- El Tampón de Lavado 20X II diluido puede ser mantenido a temperatura ambiente y puede utilizarse hasta un máximo de tres meses.

MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

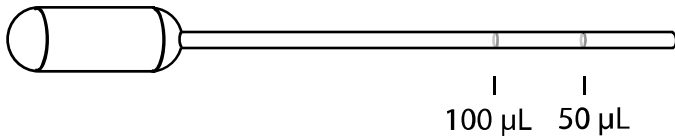
Recoja las muestras fecales en un contenedor limpio, hermético y sin conservante. Todas las muestras fecales deberían ser almacenadas a 2-8 C y procesadas lo antes posible. De manera ideal, las muestras fecales deberían ser procesadas dentro de las primeras 24 horas pero pueden ser mantenidas a 2-8 C por un máximo de 72 horas antes de ser procesadas. Si las muestras no pueden ser procesadas dentro de las primeras 72 horas, deberían ser congeladas **inmediatamente a su recepción** a una temperatura de -20 C o inferior. Un simple ciclo de congelación-descongelación no debería afectar a los resultados.¹³ Debería evitarse la congelación-descongelación reiterada de las muestras. Para diluir las muestras utilice solamente el Diluyente de Muestras provisto con el kit. La muestra puede ser almacenada diluida con el Diluyente de Muestras y dentro de un tubo sellado (tal como se describió anteriormente en el apartado **PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**) hasta un máximo de 8 horas a 2-8 C.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Permita que el kit entero, incluyendo la bolsa de micropocillos, alcance la temperatura ambiente (21-27 C) antes de ser utilizado. Después de ser utilizado, colóquelo de nuevo e inmediatamente a 2-8 C.
2. Prepare un recipiente de descontaminación para desechar reactivos y materiales.
3. No permita que los micropocillos se sequen entre un paso y otro.
4. La reproducibilidad en cualquier ensayo inmunoensayo depende en gran parte de lo coherente y minuciosamente que los micropocillos hayan sido lavados. Siga cuidadosamente el procedimiento de lavado recomendado y destacado en la parte del procedimiento del ensayo inmunoensayo. Puede utilizarse un lavador automático.
5. Prepare la cantidad que necesite de Tampón de Lavado 1X. Por ejemplo: 5,0 mL de Tampón de Lavado 20X II + 95,0 mL de agua destilada o desionizada son suficientes para lavar una tira. Coloque el tampón ya preparado en una botella surtidora de enjuague. El Tampón 1X ya preparado puede ser almacenado a 21-27 C hasta un máximo de 3 meses.
6. Un Control Positivo y un Control Negativo deben ser procesados con cada serie de muestras. Utilice el Control Positivo tal como viene provisto. **NO LO DILUYA.**
7. Utilice selladores de placa para cubrir el ensayo durante los pasos de incubación. Corte el sellador a medida y quite el papel inferior del sellador antes de colocarlo en la placa.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA (Dilución de Muestra 1:5)

1. Añada 200 µL de Diluyente de Muestra a un tubo de ensayo limpio con ensamblaje de gotero (o similar)
2. **Mezcle la muestra tan vigorosamente como sea posible antes de pipetearla.**
 - a. **Para muestras fecales líquidas o semi-sólidas:** Utilizando las pipetas de transferencia desechables y llenando hasta la primera señal de calibración (50 µL), transfiera 50 µL de materia fecal al tubo de dilución que ya contiene el Diluyente de Muestra. Enjuague la pipeta de transferencia aspirando y dispensando varias veces la suspensión de materia fecal. Saque la pipeta del tubo, agite con un vórtex la suspensión vigorosamente (durante 15 segundos) y coloque de nuevo la pipeta en el tubo.
 - b. **Para muestras fecales sólidas:** Utilizando un palillo de madera aplicador, transfiera una pequeña porción de unos 3 ó 4 mm de diámetro de la muestra que ha sido vigorosamente agitada al tubo que contiene el Diluyente de Muestra. Emulsifique la muestra fecal utilizando el palillo de madera y después agite el tubo con un vórtex durante 15 segundos. Coloque una pipeta de transferencia dentro del tubo. Proceda a realizar el ensayo con prontitud.
3. La muestra puede ser centrifugada luego de ser diluida. Centrifuge a aproximadamente 2750 x G por 5 minutos o hasta que la material sólida se separe de la líquida. Proceda con el ensayo luego de recuperar el sobrenadante.



PROCEDIMIENTO DEL TEST

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales estatales o federales.

NOTA: Cuando se procese un gran número de muestras, se pueden utilizar pipetas repetitivas o multicanal para dispensar los reactivos.

1. Cuando la bolsa haya alcanzado los 21-27 C, tome el número de micropocillos que precise (un pocillo para cada muestra mas un pocillo para el control positivo y otro para el control negativo por serie). Coloque los micropocillos en el soporte de tiras de pocillos y registre la posición de todos ellos. Los micropocillos no utilizados deben ser guardados dentro de la bolsa inmediatamente (ver **CADUCIDAD Y ALMACENAMIENTO**).
2. Utilizando la pipeta de transferencia original, aspire materia fecal diluida hasta el punto de calibración de 100 µL (segunda señal desde la punta de la pipeta) y añádala al pocillo apropiado (introduzca la pipeta hasta la mitad del pocillo y deje que la muestra se deslice lentamente hacia el interior por la pared del mismo).
3. Añada 2 gotas de Control Positivo al micropocillo correspondiente. Añada 100 µL (Segunda marca en la pipeta de transferencia) de Control Negativo (Diluyente de Muestra) al micropocillo correspondiente.
4. Añada una gota de Conjugado Enzimático (50 µL) a todos los pocillos. Agite los pocillos moviendo firmemente la placa en sentido rotatorio durante 30 segundos.
5. Corte a medida el sellador de placa y selle los micropocillos presionando el sellador firmemente en la parte superior de los mismos. Incube la placa durante 50 minutos a 35-39 C. **Alternativamente, los laboratorios equipados con un agitador-incubador de placas (tipo Stat Fax -2200) pueden incubar y rotar la placa durante 20 minutos a 37 C y a 1000 rpm (ajuste #5).**

6. **Cuidadosamente**, saque el sellador de la placa y lave los pocillos (ver **PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS**):

- a. Vierta firmemente el contenido de la placa dentro de un recipiente de residuos biopeligrosos.
 - b. Golpee la placa invertida sobre papel absorbente limpio.
 - c. Llene todos los pocillos con Tampón de Lavado 1X, dirigiendo el chorro de tampón hacia los lados de los pocillos para así evitar la formación de espuma. Proceda inmediatamente a realizar el paso 6.d.
OPCIONAL: Como alternativa, puede usar un lavador de plato automático. Escoja la selección apropiada de acuerdo a las instrucciones de manufactura.
 - d. Repita el ciclo de lavado (verter, golpear sobre papel limpio, llenar) de cuatro a seis veces (para así realizar un total de 5-7 lavados). Después del último llenado, vierta y golpee la placa sobre papel limpio lo suficientemente fuerte como para sacar el máximo exceso posible de tampón de lavado pero, nunca permitiendo que los pocillos se sequen completamente.
7. Limpie la parte inferior externa de todos los pocillos con un pañuelo de papel que no desprenda hilas.
 8. Añada dos gotas de Substrato I (100 µL) a cada pocillo.
 9. Agite rotatoria y firmemente la placa durante 10-15 segundos y después incúbelo durante 10 minutos a 21-27 C.
 10. Añada dos gotas de Solución de Parada I (100 µL) a todos los pocillos. Agite rotatoria y firmemente la placa durante 30 segundos para así asegurar un completo mezclado. Después de añadir la Solución de Parada I, espere 2 minutos antes de leer (Paso 11). **NOTA:** El color inicial de una reacción positiva es azul y cambia a amarillo al ser añadida la Solución de Parada I.
 11. Observe las reacciones:
 - a. Determinación Visual – Lea dentro de los primeros 15 minutos desde la adición de la Solución de Parada I.
 - b. Determinación Espectrofotométrica – Ponga el lector EIA a cero en aire. Limpie la parte inferior externa de los pocillos con un pañuelo de papel que no desprenda hilas. Lea la absorbancia a 450 nm ó 450/630 nm dentro de los primeros 30 minutos desde la adición de la Solución de Parada I.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. **Lectura Visual**
Negativo = de incoloro a amarillo débil (apenas visible)
Positivo = color amarillo bien definido
2. **Lectura Espectrofotométrica a Longitud de Onda Única (450 nm)**
Negativo = $DO_{450} < 0,150$
Positivo = $DO_{450} \geq 0,150$
3. **Lectura Espectrofotométrica a Longitud de Onda Dual (450/630 nm)**
Negativo = $DO_{450/630} < 0,100$
Positivo = $DO_{450/630} \geq 0,100$

Una reacción positiva extremadamente fuerte puede producir un precipitado púrpura dentro de los primeros minutos desde la parada de la reacción.

Un resultado positivo indica la presencia de toxina A y/o toxina B de *C. difficile*. Un resultado negativo indica la ausencia de toxinas A y B ó, que el nivel de toxina está por debajo del límite de detección del ensayo. La magnitud de la DO, por encima de la línea de corte (cut-off), no es indicativa de la severidad o extensión de la infección por *C. difficile*.

CONTROL DE CALIDAD

1. Los Controles Positivo y Negativo deben ser utilizados en cada serie de muestras para así obtener un aseguramiento de la calidad de los reactivos y del procedimiento. Se sugiere que los resultados de cada chequeo del control de calidad se anoten en un libro de registros apropiado para así conservar procedimientos de ensayo de alta calidad de acuerdo con los estamentos reguladores.
2. La absorbancia del Control Negativo debería ser $< 0,150$ a 450 nm y $< 0,100$ a 450/630 nm pero mayor de 0,00. Si el control es $< 0,00$, realice de nuevo el blanco en aire en el lector y lea la placa otra vez.
3. El Control Negativo, cuando se lee visualmente, debería ser desde incoloro hasta amarillo débil.
4. El Control Positivo debería dar una absorbancia $< 2,999$ pero $> 0,600$ tanto a 450 nm como a 450/630 nm. El Control Positivo, cuando se lee visualmente, debería ser de un color amarillo bien definido.
5. Si no se observaran las reacciones esperadas, por favor contacte con el Departamento de Servicio Técnico de Meridian al teléfono 513-271-3700 o contacte su distribuidor local.
6. Cualquier pocillo positivo sin color visible debería ser recolocado, su parte inferior externa limpiada y leído de nuevo.
7. En el momento de cada utilización, los componentes del kit deberían ser examinados visualmente por si existieran signos obvios de contaminación microbiana, congelación o derrame.

VALORES ESPERADOS

La frecuencia de la diarrea asociada con el uso de antibióticos y ocasionada por *C. difficile* depende de varios factores entre los cuales están la población de los pacientes, tipo de institución y la epidemiología. En los pacientes sospechosos de tener diarrea asociada con el uso de antibióticos, la incidencia reportada de enfermedad asociada con *C. difficile* es de 15-25%¹ sin embargo, es posible que diferentes instalaciones encuentren tasas de positividad por fuera de este rango.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Premier Toxins A&B detecta la presencia de toxina A y toxina B de *Clostridium difficile* en materia fecal. El hecho de no detectar toxina A ó toxina B en la materia fecal de pacientes con sospecha de enfermedad asociada a *C. difficile*, puede no excluir una verdadera enfermedad y puede ser debido a factores tales como una recogida, manipulación y almacenamiento de la muestra inapropiados o a concentraciones de toxina en la materia fecal por debajo del límite de detección del kit. El kit Premier Toxins A&B detectará toxina A a niveles $\geq 1,4$ ng/mL de materia fecal y toxina B a niveles $\geq 2,4$ ng/mL de materia fecal. La reactividad de las muestras positivas procesadas a través del ensayo Premier Toxins A&B puede disminuir con el tiempo debido a la degradación de las toxinas. Al igual que con cualquier otro ensayo diagnóstico, los resultados obtenidos a través del Premier Toxins A&B deberían ser interpretados con respecto a la historia del paciente y otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
- El funcionamiento de este ensayo no ha sido evaluado en una población pediátrica.¹⁴
- Ciertas cepas de *C. sordellii* producen toxinas que producen reacciones cruzadas inmunológicamente hablando con las toxinas A y B de *C. difficile*. No obstante, *C. sordellii* no ha sido aislado de la materia fecal de pacientes con diarrea asociada a antibióticos o con colitis pseudomembranosa mientras que *C. difficile* sí estaba presente.^{15,16}
- Aunque relativamente estable a 2-8 C, las toxinas de *C. difficile* – en concentraciones bajas particularmente – se degradan fácilmente a temperatura ambiente. La velocidad a la que las toxinas se degradan varía de muestra a muestra, de manera que no puede predecir el grado. Por esta razón, la mejor practica requiere que la muestra sea refrigerada o congelada dentro de dos horas de la colección y la muestra sea corrida dentro del tiempo recomendado en este inserto. No deben aceptar muestras que no han sido coleccionadas, manejadas o transportadas adecuadamente.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El funcionamiento de la prueba Premier Toxins A y B fue evaluado en un estudio clínico realizado en dos lugares de los EE.UU. La prueba fue comparada con el ensayo de citotoxicidad celular, y los resultados discrepantes fueron resueltos utilizando cultivos toxigénicos y pruebas EIA para las toxinas A y B producidas por otros fabricantes.

Resultados en la prueba Premier Toxins A y B	Resultado de la Citotoxina Lugar 1		Resultado de la Citotoxina Lugar 2		Resultado de la Citotoxina ambos lugares	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Pos.	55	7	35	6	90	13
Neg.	3	257	2	208	5	465
Estadística de funcionamiento	Valor	95% CI	Valor	95% CI	Valor	95% CI
Sensibilidad	94,8%	85,6-98,9%	94,6%	81,8-99,3%	94,7%	88,1-98,3%
Especificidad	97,3%	94,6-98,9%	97,2%	94,0-99,0%	97,3%	95,4-98,5%
Valor Predictivo Positivo	88,7%	78,1-95,3%	85,4%	70,8-94,4%	87,4%	81,0-93,8%
Valor Predictivo Negativo	98,8%	96,7-99,8%	99,0%	96,6-99,9%	98,9%	97,5-99,7%
Correlación	96,9%	94,4-98,5%	96,8%	93,8-98,6%	96,9%	95,1-98,1%

El funcionamiento de la prueba EIA Premier Toxins A y B fue equivalente en cada uno de los lugares donde se condujo el estudio. La sensibilidad y especificidad general de la prueba Premier Toxins A y B comparada con el método de referencia de la citotoxina fue de 94,7 y 97,3% respectivamente. El examen de las trece muestras que dieron un resultado positivo falso reveló que una dio resultado positivo en cultivo toxigénico (se aisló una cepa de *C. difficile* con capacidad para producir ambas toxinas A y B). Cuatro muestras adicionales dieron resultado positivo en otra prueba comercial de EIA para toxinas A y B. Por lo tanto, 5/13 (38%) muestras con resultado positivo falso tenían incidencia adicional e independiente compatible con la presencia de *C. difficile* toxigénico. Los cultivos toxigénicos fueron negativos en 3/5 de las muestras con resultado Premier Toxins A y B negativo y citotoxina positivo. Además, las cinco muestras también dieron resultado negativo al ser analizadas con otra prueba EIA para toxinas A y B. La prueba EIA A+B de Wampole Laboratories también fue corrida en cada lugar del estudio. Los resultados de ésta son comparados con los de la citotoxina y de la prueba Premier Toxins A y B en la tabla que se muestra a continuación:

Resultados de la prueba Premier Toxins A y B	Resultados de la prueba EIA A+B de Wampole	
	Pos.	Neg.
Pos.	92	11
Neg.	9	461
Funcionamiento Relativo	Valor	95% CI
Co-Positividad	91,1%	93,8-95,8%
Co-Negatividad	97,7%	95,6-98,7%
Concordancia	96,5%	94,5-97,7%

Resultados de la prueba EIA A+B de Wampole	Resultados de la prueba de la Citotoxina	
	Pos.	Neg.
Pos.	88	13
Neg.	7	465
Estadística de Funcionamiento	Valor	95% CI
Sensibilidad	92,6%	84,5-97,0%
Especificidad	97,3%	95,4-98,5%
Valor Predictivo Positivo	87,1%	80,6-93,7%
Valor Predictivo Negativo	98,5%	97,0-99,4%
Correlación	96,5%	94,7-97,9%

La concordancia entre las dos pruebas EIA para las toxinas A y B fue de 96,5%. Dos de las once muestras positivas con la prueba Premier Toxins A y B y negativas con la otra prueba EIA de la competencia dieron resultado positivo en la prueba de la Citotoxina, y otra muestra dio positiva en cultivo toxigénico. Ninguna de las nueve muestras positivas en la prueba EIA de la competencia y negativas en la prueba Premier Toxins A y B fueron positivas en la prueba para Citotoxina.

Wampole es una marca comercial de Wampole Laboratories

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad de la prueba EIA Premier Toxins A y B fue establecida usando muestras negativas, positivas bajas, medias y altas, y controles en triplicado en tres corridas diferentes y en tres lugares. Las variaciones dentro de la misma prueba y entre prueba y prueba fueron calculadas y se muestran a continuación:

Fuente de Variación	Control Positivo	Control Negativo	Positivo Alto	Positivo Medio	Positivo Bajo	Negativo
Absorbancia Media	2,010	0,013	2,250	1,146	0,280	0,009
CV dentro de la misma prueba	4,1%	24,5%	7,3%	6,9%	15,9%	28,9%
CV entre prueba y prueba	7,0%	16,2%	6,2%	13,9%	14,6%	31,7%

SUBSTANCIAS INTERFERENTES

Los resultados de la prueba Premier Toxins A y B no son afectados por la presencia de sangre, sulfato de bario, metronidazol o vancomicina en las muestras fecales.¹³

Se encontró que las siguientes sustancias no tienen ningún efecto en los resultados cuando están presente en las heces a las siguientes concentraciones: Sulfato de Bario (las heces diluido 1:2 con 10% Sulfato de Bario), Metronidazole (2,8 µg/pocillo), Vancomicina (2,8 µg/pocillo), y Sangre completa (50%).

ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA

La especificidad de la prueba Premier Toxins A y B fue evaluada utilizando las siguientes cepas bacterianas o virales. Muestras positivas y negativas de materia fecal fueron adicionadas con una cantidad $\geq 1 \times 10^8$ bacterias/mL y luego analizadas con la prueba Premier Toxins A y B. Los únicos dos microorganismos diferentes al *C. difficile* que reaccionaron en la prueba Premier Toxins A y B fueron dos cepas de *C. sordellii*, ATCC 9714 y VPI 9048. Ambas cepas producen homólogos HT y LT de las toxinas A y B respectivamente. Se encontró que todos los demás organismos dieron resultado negativo al ser añadidos a las materias fecales negativas. Además, éstos no interfirieron con las muestras positivas.¹³

Microorganismos o virus (# de cepas analizadas)

Adenovirus 40 & 41 (2)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	<i>Bacillus cereus</i> (1)
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	<i>Campylobacter coli</i> (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Clostridium butyricum</i> (1)
<i>Clostridium difficile</i> non-tox.(7)	<i>Clostridium haemolyticum</i> (1)	<i>Clostridium histolyticum</i> (1)
<i>Clostridium novyi</i> (1)	<i>Clostridium perfringens</i> (1)	<i>Clostridium septicum</i> (1)
<i>Clostridium sporogenes</i> (1)	<i>Clostridium tetani</i> (1)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	<i>Escherichia coli</i> (3)	<i>Helicobacter pylori</i> (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1)	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> (1)
<i>Proteus vulgaris</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	<i>Rotavirus</i> (1)
<i>Salmonella typhimurium</i> (1)	<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
<i>Shigella flexneri</i> (1)	<i>Shigella sonnei</i> (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> (1)
<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan I) (1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1)	<i>Streptococcus faecalis</i> (1)
<i>Vibrio cholerae</i> (1)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)

La prueba Premier Toxins A y B también fue evaluada utilizando varias cepas de referencia de *C. difficile*. Las cepas fueron cultivadas en caldo BHI durante 48 horas y su reactividad fue analizada en la prueba Premier Toxins A y B. Los resultados que están resumidos en la tabla que se muestra a continuación, indicaron que la prueba identificó correctamente todas las cepas toxigénicas de *C. difficile*, aun aquellas que sólo producen toxina B. No se observó reactividad cruzada con las cepas no toxigénicas de *C. difficile*.

Tipo de <i>C. difficile</i>	# de Premier Toxins A y B Pos/Total (% Correcto)
A+ / B+	25/25 (100%)
A- / B+	3/3 (100%)
A- / B-	0/14 (100%)

DEUTSCH

PREMIER™ TOXINS A & B

REF Bestellnummer 616096

IVD In-vitro-Diagnostikum

Enzymimmunoassay zum Nachweis von *Clostridium difficile* Toxin A und Toxin B in Stuhlproben

VERWENDUNGSZWECK

Der Premier Toxins A&B ist ein qualitativer Enzymimmunoassay (EIA) zum Nachweis von *Clostridium difficile* Toxin A und Toxin B im Stuhl von Patienten mit einer Antibiotikum-assoziierten Diarrhoe. Der Premier Toxins A&B Test soll die Diagnose von *C. difficile*-assoziierten Erkrankungen unterstützen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Der Toxinbildner *Clostridium difficile* ist einer der wichtigsten Erreger der Antibiotikum-assoziierten Diarrhoe und Kolitis¹ und der Auslöser von praktisch allen Fällen pseudomembranöser Kolitis.^{2,3} Obwohl rund 2% aller gesunden Erwachsenen mit *C. difficile*⁴ besiedelt sind, erwerben viele Patienten diesen Organismus durch nosokomiale Infektionen.⁵ Den meisten Antibiotika wird eine Förderung der Proliferation der Toxin-Bildners *C. difficile* durch die Zerstörung der natürlichen Darmflora zugeschrieben.⁶ Zwei Toxine, Toxin A und Toxin B, werden mit der Erkrankung, die durch *C. difficile* ausgelöst wird, in Verbindung gebracht.⁷ Diese Toxine unterscheiden sich immunochemisch und biologisch. Das Antiserum gegen reines Toxin A bzw. Toxin B zeigt keine Kreuzreaktion mit dem jeweils anderen Toxin.⁸ Toxin A wird als Enterotoxin beschrieben, das eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität mit nachfolgender Ansammlung von Darmflüssigkeit und Diarrhoe auslöst.⁹ Toxin B ist ein starkes Zytotoxin, das in Zellkulturen eine Abrundung der Zellen verursacht.^{7,10} Bei Hamstern ist das Toxin B tödlich, wenn es entweder allein intravenös oder in Kombination mit sublethalen Dosen von Toxin A intragastral verabreicht wird.¹¹ Die Rolle von Toxin B bei der Entwicklung der Darmerkrankung ist unklar. Es wurde jedoch die Hypothese aufgestellt, dass die beiden Proteine in vivo synergistisch wirken.^{11,12}

Der häufigste Test in der Diagnose der *C. difficile*-Kolitis ist die Bestimmung von Toxin B aus Patientenstuhlproben durch Zellkultur, wobei das Toxin durch ein spezifisches Antiserum neutralisiert wird. Dieser Test ist zwar extrem empfindlich und das Vorkommen von Toxin B korreliert positiv mit 90-100% der Fälle schwerer Erkrankungen,^{1,7} es müssen jedoch die Voraussetzungen zur Zellkultivierung vorhanden sein, und die Inkubation dauert bis zu 72 Stunden. Hinzu kommt, dass der Zytotoxin-Test nicht standardisiert ist, Testdurchführung und eingesetzte Zelllinien variieren beträchtlich.⁹

TESTPRINZIP

Der Premier Toxins A&B ist ein Enzymimmunoassay zum direkten Nachweis von *Clostridium difficile* Toxin A und Toxin B in Stuhlproben. Mikrotiterkavitäten, die einzeln von den Platten abzubrechen sind, sind mit Toxinspezifischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern beschichtet. Verdünnte Patientenproben und polyklonale Antikörper gegen Toxin A und B, die mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugiert sind, werden in die Kavitäten gegeben. Wenn eines der Toxine in der verdünnten Patientenprobe vorhanden ist, bilden sich Komplexe aus HRP-konjugierten polyklonalen Antikörpern (spezifisch für beide Toxine) und Toxinen. Nach dem Waschen bleiben diese Komplexe in den Kavitäten. Nach einem abschließenden Waschschritt wird Substrat/Chromogen (Peroxid und Tetramethylbenzidin) in die Kavitäten gegeben. Evtl. gebundenes Konjugat verwandelt das Substrat/Chromogen in ein blaues Produkt. Durch Zugabe von Säure (Stopplösung (Premier Stop Solution I) wechselt die Farbe von blau nach gelb.

REAGENZIEN/MITGELIEFERTEN MATERIALIEN

1. **Premier Toxins A&B Antikörper-beschichtete Kavitäten** - Plastik-Kavitäten, einzeln abbrechbar, beschichtet mit monoklonalen Maus anti-Toxin A-Antikörpern und polyklonalen Ziegen anti-Toxin B-Antikörpern.
2. **Premier Toxins A&B Positivkontrolle** - inaktivierte Toxine A und B in einer gepufferten Proteinlösung konserviert mit Gentamycin und Thimerosal (0,02%)
3. **Premier Toxins A&B Probenverdünnungspuffer/Negativkontrolle** - gepufferte Proteinlösung konserviert mit Gentamycin und Thimerosal (0,02%)
4. **20 fach Waschpuffer (Premier 20X Wash Buffer II)** - konzentrierter Waschpuffer konserviert mit 0,2% Thimerosal
5. **Premier Toxins A&B Enzymkonjugat** - polyklonale anti-Toxin A und anti-Toxin B-Antikörper der Ziege konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase in einer gepufferten Proteinlösung konserviert mit Gentamycin und 0,02% Thimerosal
6. **Substrat (Premier Substrate I)** -Gepufferte Lösung mit Peroxid und Tetramethylbenzidin
7. **Stopplösung (Premier Stop Solution I)** - 1M Phosphorsäure. VORSICHT: Hautkontakt vermeiden. Wenn doch Kontakt auftritt, mit Wasser spülen.
8. **Transferpipetten für Proben**
9. **Klebefolien zur Versiegelung der Streifen**

Die maximale Zahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der äußeren Schachtel angegeben.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

1. Reagenzröhrchen zur Probenverdünnung
2. Destilliertes oder deionisiertes Wasser
3. OPTIONAL: EIA-Plattenphotometer für Extinktionsmessungen bei 450 nm oder 450/630 nm*
4. Spritzflasche
5. Pipetten und Messzylinder zur Herstellung des 1fach konzentrierten Waschpuffers
6. Holzspatel
7. Papiertücher
8. Brutschrank 37 ± 2 C
9. Stopp-Uhr
10. Vortex-Rüttler
11. Abfallbehälter mit Desinfektionsmittel (dh. 10% ige Lösung eines Haushaltsbleichmittels) und/oder autoklavierbare Beutel für potentiell pathogenen Abfall
12. Einmalhandschuhe
13. OPTIONAL: Zentrifuge
14. OPTIONAL: Stat Fax™ – 2200* Inkubator/Rüttler für die 20 minütige Inkubation*
15. OPTIONAL: Halbautomatisches Mikrotiterplattenwaschgerät*

* HINWEIS: Der Benutzer ist dafür verantwortlich, das halbautomatische Plattenwaschgerät, die Brutkästen und die Messgeräte vor ihrem Einsatz mit diesem Produkt zu bestätigen.

*Stat Fax™ ist ein Warenzeichen der Awareness Technology, Inc.

VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Alle Reagenzien sind nur zur in vitro Diagnostik bestimmt.
2. Die Reagenzien des Testkits sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (21-27 C) gebracht werden und vorsichtig gemischt werden.
3. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
4. In den Bereichen, in denen mit den Proben oder den Test-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
5. Einmalhandschuhe während des Umgangs mit Proben tragen und danach die Hände sorgfältig waschen.
6. Kavitäten, Enzymkonjugat, Substrat und Positivkontrolle aus Testkits unterschiedlicher Chargennummer nicht austauschen. (Der Probenverdünnungspuffer, das Waschpufferkonzentrat (Premier 20 X Wash Buffer II) und die Stopplösung (Premier Stop Solution I) mit derselben Reagenznummer sind chargenübergreifend verwendbar solange das Verfallsdatum nicht abgelaufen ist.).
7. Den Testkit nicht nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums, das auf dem Etikett angegeben ist, verwenden.
8. Die Stopplösung I enthält 1M Phosphorsäure. Falls ein Kontakt mit Haut oder Schleimhaut auftritt, sofort mit Wasser spülen.
9. Patientenproben können infektiös sein und sollten nach den Biosafety Level 2 – Richtlinien - wie im CDC/NIH Handbuch "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories," 2007 beschrieben - gehandhabt werden.
10. Bei der Handhabung, dem Verdünnen oder dem Transfer von Proben jedes Verspritzen oder Zerstäuben vermeiden.
11. Mikrobielle Verunreinigung der Reagenzien vermeiden, dies kann zu falschen Ergebnissen führen.
12. Die mitgelieferten Transferpipetten müssen für die Probenvorbereitung und den Transfer benutzt werden. Eine pro Probe verwenden. Gegenseitige Verunreinigung der Proben oder Reagenzien kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. **Alle Stuhlproben müssen - unabhängig von der Konsistenz - sorgfältig gemischt werden, um eine repräsentative Probe pipettieren zu können.**
14. Die Reagenzienkonzentrationen, die Inkubationszeiten und Temperaturen wurden im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität optimiert. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn diese Vorgaben eingehalten werden.
15. Die Positivkontrolle enthält die inaktivierten Toxine A und B. Sie sollte dennoch als möglicherweise infektiös gehandhabt werden
16. Alle Fläschchen senkrecht halten, um eine sorgfältige Zugabe von Tropfen der richtigen Größe zu erzielen.
17. Mit den Flaschenspitzen die Mikrotiterkavitäten nicht berühren.
18. Die Fläschchen mit den Deckeln der richtigen Farbe wiederverschließen.
19. Alle Reagenzien werden in der gebrauchsfertigen Konzentration (mit Ausnahme des 20fach konzentrierten Waschpuffers II) geliefert. Nicht verdünnen.
20. Jede Unter- und Überschreitung der vorgegebenen Inkubationszeiten kann die Sensitivität und Spezifität beeinträchtigen und sollte vermieden werden.
21. Mikrotiterkavitäten nicht verwenden wenn der Folienbeutel beschädigt ist. (dh Löcher oder Einstich).

GEFAHREN – UND SICHERHEITSAANGABEN

WASCHPUFFER Premier 20X Wash Buffer II: THIMEROSAL - Gesundheitsschädlich R-SATZ E

20/21/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
33	Gefahr kumulativer Wirkungen

S-SATZ

36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
-------	---------------------------------------------------------------------

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

1. Alle Testkit-Reagenzien bei 2-8 C lagern. Den Kit sofort nach Gebrauch wieder in den Kühlschrank legen.
2. Die Mikrotiterkavitäten im Beutel lassen, bis dieser Raumtemperatur erreicht hat, um so Kondensationen zu vermeiden. Alle unbenutzten Mikrotiterkavitäten und das Trockenmittel in den Beutel mit Reißverschluss zurücklegen und fest verschließen.
3. Der verdünnte Arbeits-Waschpuffer (Premier 20X Wash Buffer II) kann bei Raumtemperatur aufbewahrt und bis zu drei Monate lang verwendet werden.

PROBENHANDHABUNG

Stuhlproben in einen sauberen, luftdichten Behälter ohne Konservierungsmittel geben. Alle Stuhlproben sollten bei 2-8 C gelagert werden und so bald wie möglich analysiert werden. Idealerweise werden die Stuhlproben innerhalb von 24 Stunden analysiert, die Proben können jedoch bei 2-8 C bis zu 72 Stunden bis zur Analyse gelagert werden. Wenn die Proben nicht innerhalb von 72 Stunden analysiert werden können, sollten sie **sofort nach Erhalt** bei – 20 C oder kälter eingefroren werden. Einmaliges Einfrieren und Auftauen sollte das Ergebnis nicht beeinflussen.¹³ Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Benutzen Sie nur den **PROBENVERDÜNNUNGSPUFFER** dieses Testkits zur Verdünnung der Proben. Die Proben können, wenn sie mit Probenverdünnungspuffer verdünnt wurden, in einem verschlossenen Reagenzglaschen (wie bei **VORBEREITUNG DER REAGENZIEN** beschrieben s.u.) bis zu 8 Stunden bei 2-8 C aufbewahrt werden.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

1. Den gesamten Kit, einschließlich des Beutels mit Mikrotiterkavitäten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (21-27 C) bringen. Sofort nach Gebrauch wieder auf 2-8 C kühlen.
2. Ein Desinfektionsgefäß für die Entsorgung von Reagenzien und anderen Verbrauchsmaterialien bereitstellen.
3. Mikrotiterkavitäten zwischen den einzelnen Schritten nicht austrocknen lassen.

- Die Reproduzierbarkeit eines jeden EIA ist stark von der Gleichförmigkeit und Sorgfalt abhängig, mit der die Mikrotiterkavitäten gewaschen werden. Die in der EIA-Anleitung empfohlenen Waschschritte genau beachten. Ein automatisches Platten-Waschgerät kann benutzt werden.
- Ausreichend einfach konzentrierten Arbeits-Waschpuffer herstellen. Zum Beispiel: 5,0 mL des 20fach konzentrierten Waschpuffers (Premier 20X Wash Buffer II) + 95,0 mL destilliertes oder deionisiertes Wasser reichen zum Waschen eines Streifens aus. In eine saubere Spritzflasche füllen. Der Arbeits-Waschpuffer kann bei 21-27 C bis zu 3 Monate lang gelagert werden.
- Mit jedem Testlauf muss eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitlaufen. Die Positivkontrolle wie geliefert verwenden, **NICHT VERDÜNNEN**.
- Verwenden Sie die Klebefolie zum Verschließen der EIA-Platte während der Inkubationsschritte. Vor Gebrauch passend zurechtschneiden, dann den Papierrücken entfernen.
- Zwei frei fallende Tropfen Stopplösung I (100 µL) in alle Kavitäten geben. Die Platte 30 Sekunden lang stark schütteln, um eine vollständige Durchmischung sicherzustellen. Nach der Zugabe von Stopplösung I zwei Minuten bis zum Ablesen warten (Schritt 11). **ACHTUNG:** Zunächst ist die Farbe bei positiver Reaktion blau, sie schlägt in gelb um, wenn Stopplösung I zugegeben wird.
- Die Reaktionen ablesen:
 - Ablesen mit bloßem Auge: innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung I ablesen
 - Spektrophotometrische Bestimmung: das EIA-Plattenlesegerät gegen Luft abgleichen. Die Unterseite der Kavitäten mit einem fusselfreien Tuch abwischen. Die Extinktion bei 450 nm oder 450/630 nm innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung I ablesen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- Ablesen mit bloßem Auge**
Negativ = farblos bis schwach (kaum sichtbar) gelb
Positiv = deutlich gelbe Farbe
- Spektrophotometrische Bestimmung bei einfacher Wellenlänge (450 nm)**
Negativ = $OD_{450} < 0,150$
Positiv = $OD_{450} \geq 0,150$
- Spektrophotometrische Bestimmung bei zweifacher Wellenlänge (450/630 nm)**
Negativ = $OD_{450/630} < 0,100$
Positiv = $OD_{450/630} \geq 0,100$

Bei extrem stark positiver Reaktion kann sich ein purpurner Niederschlag innerhalb weniger Minuten nach Abstoppen der Reaktion bilden.

Ein positives Ergebnis zeigt das Vorkommen von *C. difficile* Toxin A und/oder B an. Ein negatives Ergebnis zeigt an, dass keine Toxine A oder B vorhanden sind, oder dass ihre Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegen. Die Höhe des Extinktionswerts (OD) über dem Cut-off-Wert sagt nichts über den Schweregrad oder das Ausmaß der *C. difficile* Infektion aus.

QUALITÄTSKONTROLLE

- Positiv- und Negativkontrollen müssen in jedem Testlauf mitbestimmt werden, um die Qualität der Reagenzien und der Testdurchführung zu überprüfen. Es ist empfehlenswert, die Ergebnisse einer jeden Qualitätskontrolle in einem geeigneten Laborjournal festzuhalten, um die hohe Qualität der Testdurchführung und das Einhalten behördlicher Bestimmungen zu dokumentieren.
- Die Negativkontrolle sollte bei 450 nm < 0,150 und bei 450/630 nm < 0,100 aber größer als 0,00 sein. Wenn die Kontrolle < 0,00 ist, sollte das Platten-Photometer erneut gegen Luft abgeglichen werden und die Platte nochmals abgelesen werden.
- Wenn sie mit bloßem Auge abgelesen wird sollte die Negativkontrolle farblos bis schwach gelb sein.
- Die Positivkontrolle sollte < 2,999 aber > 0,600 sowohl bei 450 nm als auch bei 450/630 nm sein. Die Positivkontrolle sollte eine deutlich gelbe Farbe beim Ablesen mit bloßem Auge haben.
- Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, zur Ermittlung der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer.
- Jede positive Kavität ohne sichtbare Farbe sollte erneut eingesetzt, an der Unterseite abgewischt und nochmals abgelesen werden.
- Bei jedem Gebrauch sollten die Testbestandteile auf sichtbare Anzeichen von mikrobieller Verunreinigung, von Vereisungen oder von Undichtigkeiten untersucht werden.

ERWARTETE WERTE

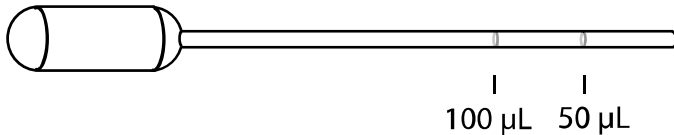
Die Häufigkeit von Antibiotika-assoziiertes Diarrhoe, die von *C. difficile* verursacht wird, ist von mehreren Faktoren abhängig wie: von der Patientenpopulation und der Epidemiologie. Die Inzidenz von *C. difficile*-assoziierten Erkrankungen bei Patienten mit Verdacht auf Antibiotika-assoziiertes Diarrhoe wird mit 15-25%¹ angegeben, obwohl verschiedene Labors Positivraten außerhalb dieses Bereichs finden können.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Der Premier Toxins A&B Test weist das Vorkommen der Toxine A und B von *Clostridium difficile* im Stuhl nach. Wenn der Nachweis von Toxin A oder Toxin B im Stuhl von Patienten mit Verdacht auf eine mit *C. difficile* assoziierte Erkrankung nicht gelingt, kann eine tatsächliche Erkrankung nicht ausgeschlossen werden. Dies kann vielmehr auf Fehler bei der Probenahme, -handhabung und -lagerung oder auf eine Toxin-Konzentration im Stuhl unter der Nachweisgrenze dieses Tests zurückzuführen sein. Der Premier Toxins A&B Testkit weist Toxin A in Konzentrationen $\geq 1,4$ ng/mL Stuhl und Toxin B in Konzentrationen $\geq 2,4$ ng/mL Stuhl nach. Die Reaktivität positiver Proben kann – wie es mit dem Premier Toxins A&B Test bestimmt wurde – mit der Zeit aufgrund eines Abbaus der Toxine abnehmen. Wie bei jedem diagnostischen Test sollten die Ergebnisse des Premier Toxins A&B Tests unter Berücksichtigung der Patientenanamnese und anderer klinischer und Laborbefunde interpretiert werden.
- Das Leistungsprofil dieses Tests wurde nicht für pädiatrische Populationen bestimmt.¹⁴
- Bestimmte Stämme von *C. sordellii* bilden ein Toxin, das immunologisch mit den *C. difficile* Toxinen A und B kreuzreagiert. *C. sordellii* wurde bisher nicht isoliert, der Erreger wurde jedoch in Stuhlproben von Patienten mit einer Antibiotika-assoziiertes Diarrhoe oder pseudomembranösen Kolitis gleichzeitig mit *C. difficile* gefunden.^{15,16}

VORBEREITUNG DER PROBEN (1:5 Probenverdünnung)

- 200 µL des Probenverdünnungspuffers mit dem Tropfer (oder Vergleichbarem) in ein sauberes Reagenzröhrchen füllen.
- Stuhl so sorgfältig wie möglich vor dem Pipettieren durchmischen.**
 - Bei flüssigen oder halbfesten Stuhlproben:** mit einer Einmal-Transferpipette 50 µL Stuhl bis zur ersten Kalibrierungsmarkierung abmessen und in das Verdünnungsröhrchen mit Probenverdünnungspuffer geben. Die Transferpipette durch mehrmaliges Aufziehen und Ausdrücken ausspülen. Die Pipette entfernen, und die Suspension sorgfältig (15 Sekunden lang) auf dem Rüttler mischen, die Pipette in das Röhrchen zurückstecken.
 - Bei festen Stuhlproben:** mit einem Holzspatel eine kleine Portion der sorgfältig gemischten Stuhlprobe mit 3-4 mm Durchmesser in den Probenverdünnungspuffer geben. Den Stuhl mit dem Holzspatel aufemulgieren und dann 15 Sekunden lang auf dem Rüttler durchmischen. Eine Transferpipette in das Röhrchen stecken. Die Probe unmittelbar weiterverarbeiten.
- Die Stuhlproben können nach der Verdünnung zentrifugiert werden. Zentrifugieren Sie die Proben bei ungefähr 2750 G für 5 Minuten oder bis die festen Bestandteile sich von der Flüssigkeit trennen. Führen Sie den Test mit dem Überstand durch.



TESTDURCHFÜHRUNG

Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.

ACHTUNG: Bei großen Probenzahlen können für das Pipettieren der Reagenzien Mehrfach- oder Multikanal-Pipetten verwendet werden.

- Nachdem der Beutel 21-27 C erreicht hat, die benötigte Anzahl von Mikrotiterkavitäten (eine Kavität pro Probe plus eine Positiv- und eine Negativkontrolle pro Testlauf) abbrechen. Die Kavitäten in die Halterung für die Streifen geben und den Platz jeder Kavität notieren. Unbenutzte Kavitäten müssen sofort wieder im Beutel verschlossen werden (siehe **HALTBARKEIT UND LAGERUNG**).
- Mit der ursprünglichen Transferpipette verdünnten Stuhl bis zur 100 µL Markierung (zweite Markierung von der Pipetten-Spitze) aufziehen und in die jeweilige Kavität geben (die Pipettenspitze halb in die Kavität einbringen und die Probe langsam an der Seite der Kavität hinunterlaufen lassen).
- Zwei freifallende Tropfen der Positivkontrolle und 100 µL (zweite Markierung von der Pipetten-Spitze) dem Probenverdünnungspuffer/Negativkontrolle in die dafür vorgesehenen Kavitäten geben.
- Einen frei-fallenden Tropfen des Enzym-Konjugats (50 µL) in alle Kavitäten geben. Die Kavitäten durch kräftiges Schütteln 30 Sekunden lang durchmischen.
- Die Klebefolie zum Verschließen der Platte passend zurechtschneiden und fest auf die Mikrokavitäten drücken. Die Platte 50 Minuten lang bei 35-39 C inkubieren. **Alternativ dazu können Labors, die mit einem heizbaren Plattenrüttler (Stat Fax™-2200) ausgestattet sind, die Platte 20 Minuten lang bei 37 C und 1000 rpm (Einstellung 5) inkubieren und rotieren lassen.**
- Die Folie **vorsichtig** entfernen und die Kavitäten waschen (siehe **VORBEREITUNG DER REAGENZIEN**):
 - Die Inhalte der Platte in ein Gefäß für potentiell pathogenen Abfall auskippen.
 - Die umgedrehte Platte auf einem sauberen Stapel Papiertücher ausklopfen.
 - Alle Kavitäten mit Arbeits-Waschpuffer füllen, den Strahl des Puffers dabei auf die Wände der Kavitäten richten, um Schaumbildung zu vermeiden. Sofort mit Schritt 6d fortfahren.

OPTIONAL: Ein halbautomatisches Waschgerät für Mikrotiterplatten kann wahlweise benutzt werden. Die geeignete Einstellung wählen um in Übereinstimmung mit den Herstelleranweisungen zu sein. Nachdem das automatische waschen fertig ist, sofort mit Schritt 7 fortfahren.

 - Den Waschzyklus (Auskippen, Ausklopfen auf frischen Papiertüchern, Füllen) vier- bis sechsmal wiederholen (insgesamt 5-7 Waschschritte). Nach dem letzten Füllen die Platten auskippen und auf frischen Tüchern hart genug ausklopfen, um soviel überschüssigen Waschpuffer wie möglich zu entfernen, die Kavitäten aber zu keiner Zeit vollständig austrocknen lassen.
- Die Unterseite aller Kavitäten mit einem fusselfreien Tuch säubern.
- Zwei frei fallende Substrattropfen I (100 µL) in jede Kavität geben.
- Die Platte 10 – 15 Sekunden lang kräftig schütteln, dann 10 Minuten lang bei 21-27 C inkubieren.

4. Obwohl relativ stabil bei 2 bis 8 C, können die Toxine von *C. difficile* sich bei Raumtemperatur, besonders bei schwacher Konzentration, leicht beschädigen. Die Geschwindigkeit der Toxin-Beschädigung ist von einer Probe zu anderen unterschiedlich. Die Geschwindigkeit der Toxin-Beschädigung kann nicht bestätigt werden. Aus diesem Grund sollten die Proben in den folgenden zwei Stunden nach Probenabnahme gekühlt oder eingefroren werden. Die Proben sollten in dem Zeitraum, wie in der Packungsbeilage empfohlen, getestet werden. Testen Sie keine Proben, die nicht korrekt entnommen, gehandhabt oder transportiert wurden.

LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsfähigkeit des Premier Toxins A&B Tests wurde in einer klinischen Studie an zwei Zentren in den USA überprüft. Sie wurde mit dem Test auf zelluläre Zytotoxizität verglichen, abweichende Ergebnisse wurden anhand von Kulturen auf toxische Keime und mit einem Konkurrenz-EIA auf Toxin A und B endgültig bewertet.

Premier Toxins A&B Ergebnisse	Ergebnisse des Zytotoxin-Tests Zentrum 1		Ergebnisse des Zytotoxin-Tests Zentrum 2		Ergebnisse des Zytotoxin-Tests alle Zentren	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Pos.	55	7	35	6	90	13
Neg.	3	257	2	208	5	465
Leistungsstatistik	Wert	95% VI*	Wert	95% VI*	Wert	95% VI*
Sensitivität	94,8%	85,6-98,9%	94,6%	81,8-99,3%	94,7%	88,1-98,3%
Spezifität	97,3%	94,6-98,9%	97,2%	94,0-99,0%	97,3%	95,4-98,5%
Positiver prädiktiver Wert	88,7%	78,1-95,3%	85,4%	70,8-94,4%	87,4%	81,0-93,8%
Negativer prädiktiver Wert	98,8%	96,7-99,8%	99,0%	96,6-99,9%	98,9%	97,5-99,7%
Korrelation	96,9%	94,4-98,5%	96,8%	93,8-98,6%	96,9%	95,1-98,1%

* VI= Vertrauensintervall

Die Leistungsfähigkeit des Premier Toxins A&B Tests war in beiden Studienzentren gleichwertig. Die Gesamtsensitivität und -spezifität verglichen mit der Referenz-Zytotoxin-Methode lag bei 94,7% bzw. 97,3%. Die Untersuchung der 13 falsch positiven Proben ergab, dass eine dieser Proben in der Kultur auf toxische *C. difficile* positiv war (d.h. in dieser Kultur wurde ein *C. difficile*-Stamm isoliert, der beide Toxine A und B produzierte). Vier andere Proben waren im Konkurrenz-EIA auf Toxin A und B positiv. Für fünf von 13 (38%) falsch positiven Proben gibt es also zusätzlich unabhängige Beweise für das Vorkommen von toxischen *C. difficile*. Die Kultur auf toxische Keime war bei drei von fünf Proben, die im Premier Toxin A&B Test negativ und im Zytotoxin-Test positiv waren, negativ. Hinzu kommt, dass alle fünf Proben im Konkurrenz-EIA auf Toxin A und B negativ waren.

Ein Konkurrenz-EIA (Wampole™ Laboratories) auf Toxin A und B wurde in jedem Studienzentrum parallel durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Zytotoxin-Test und dem Premier Toxins A&B Test verglichen (s. unten)

Ergebnisse des Premier Toxins A&B Tests	Wampole A/B EIA	
	Pos.	Neg.
Pos.	92	11
Neg.	9	461
Relative Leistungsfähigkeit	Wert	95% VI
Co-Positivität	91,1%	93,8-95,8%
Co-Negativität	97,7%	95,6-98,7%
Übereinstimmung	96,5%	94,5-97,7%

Ergebnisse des Wampole Toxins A/B Tests	Ergebnisse des Zytotoxintests	
	Pos.	Neg.
Pos.	88	13
Neg.	7	465
Leistungsstatistik	Wert	95% VI
Sensitivität	92,6%	84,5-97,0%
Spezifität	97,3%	95,4-98,5%
Positiver prädiktiver Wert	87,1%	80,6-93,7%
Negativer prädiktiver Wert	98,5%	97,0-99,4%
Korrelation	96,5%	94,7-97,9%

Die Übereinstimmung zwischen den beiden EIAs auf Toxin A und B betrug 96,5%. Zwei der 11 Proben, die im Premier Toxins A&B Test positiv und im Konkurrenz-EIA negativ waren, waren im Zytotoxin-Test positiv und bei einer weiteren Probe konnten toxische Keime in der Kultur nachgewiesen werden. Keine der 9 Proben, die im Konkurrenz-EIA positiv und im Premier Toxins A&B Test negativ waren, waren im Zytotoxin-Test positiv.

Wampole™ ist ein Warenzeichen der Wampole Laboratories

REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit des Premier Toxins A&B-Tests wurde anhand von negativen, schwach, mittel und stark positiven Proben und Kontrollen gemessen. Dabei wurden je drei Aliquots der Proben bzw. Kontrollen in drei verschiedenen Testläufen an drei Zentren analysiert. Die Variabilität innerhalb eines Testlaufs (intra-assay variance oder variability oder variation) sowie zwischen den Testläufen (inter-assay variance) wurde berechnet und ist unten angegeben.

Varianz	Positiv Kontrolle	Negativ Kontrolle	Stark Positiv	Mittel Positiv	Schwach Positiv	Negativ
Mittler Extinktion	2,010	0,013	2,250	1,146	0,280	0,009
Varianz innerhalb eines Testlaufs	4,1%	24,5%	7,3%	6,9%	15,9%	28,9%
Varianz zwischen den Testläufen	7,0%	16,2%	6,2%	13,9%	14,6%	31,7%

STÖRENDE SUBSTANZEN

Die Ergebnisse des Premier Toxins A&B-Tests werden durch Blut, Bariumsulfat, Metronidazol oder Vancomycin in den Stuhlproben nicht beeinflusst.¹³

Die folgenden Substanzen beeinflussten die Ergebnisse nicht, wenn sie in den angegebenen Konzentrationen in Stuhlproben enthalten waren: Bariumsulfat (Eine Stuhlprobe wurde im Verhältnis 1:2 mit einer 10% Bariumsulfat Lösung verdünnt), Metronidazol (2,8 µg/Vertiefungen), Vancomycin (2,8 µg/Vertiefungen), und Vollblut (50%).

TESTSPEZIFITÄT

Die Spezifität des Premier Toxins A&B Tests wurde mit den folgenden Bakterien- und Virus-Stämmen überprüft. Positive und negative Stuhlproben wurden mit $\geq 1 \times 10^8$ Bakterien/mL beimpft und mit dem Premier Toxins A&B Test getestet. Die einzigen Mikroorganismen außer *C. difficile*, die im Premier Toxins A&B-Test positiv waren, waren zwei Stämme von *Clostridium sordellii*, ATCC 9714 und VPI 9048. Beide Stämme produzieren die zu den Toxinen A und B homologen HT bzw. LT. Alle anderen Organismen zeigten nach Überimpfung in negative Stühle negative Ergebnisse. Sie zeigten zudem keine Wechselwirkungen mit den positiven Proben.¹³

Die untersuchten Mikroorganismen oder Viren (Anzahl der untersuchten Stämme)

Adenovirus 40 & 41 (2)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	<i>Bacillus cereus</i> (1)
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	<i>Campylobacter coli</i> (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Clostridium butyricum</i> (1)
<i>Clostridium difficile</i> non-tox.(7)	<i>Clostridium haemolyticum</i> (1)	<i>Clostridium histolyticum</i> (1)
<i>Clostridium novyi</i> (1)	<i>Clostridium perfringens</i> (1)	<i>Clostridium septicum</i> (1)
<i>Clostridium sporogenes</i> (1)	<i>Clostridium tetani</i> (1)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	<i>Escherichia coli</i> (3)	<i>Helicobacter pylori</i> (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1)	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> (1)
<i>Proteus vulgaris</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	<i>Rotavirus</i> (1)
<i>Salmonella typhimurium</i> (1)	<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
<i>Shigella flexneri</i> (1)	<i>Shigella sonnei</i> (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> (1)
<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan I) (1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1)	<i>Streptococcus faecalis</i> (1)
<i>Vibrio cholerae</i> (1)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)

Der Premier Toxins A&B-Test wurde auch mit mehreren Referenzstämmen von *C. difficile* überprüft. Die Stämme wurden in BHI-Nährlösung 48 Stunden lang gezüchtet und mit dem Premier Toxins A&B-Test auf Reaktivität überprüft. Die Ergebnisse sind unten zusammengefasst. Sie zeigen, dass der Test alle toxischen Stämme von *C. difficile* korrekt identifizierte, sogar diejenigen, die nur Toxin B produzieren. Es wurde keine Kreuzreaktivität mit nichttoxischen Stämmen von *C. difficile* beobachtet.

<i>C. difficile</i> Art	Anzahl von Premier Toxins A&B Test positiven Proben/ Gesamtproben (% richtig)
A+ / B+	25/25 (100%)
A- / B+	3/3 (100%)
A- / B-	0/14 (100%)

REFERENCES

- Bartlett JG. 1990. *Clostridium difficile*: clinical considerations. Rev Infect Dis. 12 S243-S251.
- Bartlett JG, TW Chang, M Gurwith, SL Gorbach and AB Onderdonk. 1978. Antibiotic associated pseudomembranous colitis due to toxin producing clostridia. N Engl J Med 298: 531-534.
- George WL, VL Sutter, EJC Goldstein, SL Ludwig and SM Finegold. 1978. Aetiology of anti-microbial agent associated colitis. Lancet. 1: 802-803.
- Rolfe RD. 1988. Asymptomatic intestinal colonization by *Clostridium difficile*. In: RD Rolfe and SM Finegold (eds.). *Clostridium difficile*: its role in intestinal disease. Academic Press, Inc. New York.
- McFarland LV, ME Mulligan, RYY Kwok and WE Stamm. 1989. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. New Engl J Med. 320:204-210.
- Johnson S, A Adelman, CR Clabots, LR Peterson, DN Gerding. 1989. Recurrences of *Clostridium difficile* diarrhea not caused by the original infecting organism. J Infect Dis. 159 (2):340-343.
- Sullivan NM, S Pellett, TD Wilkins. 1982. Purification and characterization of Toxins A and B of *Clostridium difficile*. Infect Immun. 35(3): 1032-1040.
- Lyerly DM, CJ Phelps, J Toth and TD Wilkins. 1986. Characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile* with monoclonal antibodies. Infect Immun. 54(1):70-76.
- Lyerly DM, CJ Phelps, and TM Wilkins. 1985. Monoclonal and specific polyclonal antibodies for immunoassay of *Clostridium difficile* Toxin A. J Clin Microbiol. 21(1): 12-14.
- Chang TW, M Laueremann and JG Bartlett. 1980. Cytotoxicity assay in antibiotic-associated colitis. J Infect Dis. 140:765-770.
- Lyerly DM, KE Saum, DK McDonald, and TD Wilkins. 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. Infect Immun. 47:349-352.
- Meador J, and RK Tweten. 1988. Purification and characterization of toxin B from *Clostridium difficile*. Infect Immun. 56(7):1708-1714.
- Data on file, Meridian Bioscience, Inc.
- Cooperstock, M. 1988. *Clostridium difficile* in infants and children. In: RD Rolfe and SM Finegold (eds.). *Clostridium difficile*: its role in intestinal disease. Academic Press, Inc. New York.
- Lyerly DM and TD Wilkins. 1988. Purification and properties of toxins A and B of *Clostridium difficile*. In: RD Rolfe and SM Finegold (eds.). *Clostridium difficile*: its role in intestinal disease. Academic Press, Inc. New York.
- Wiley SH and JG Bartlett. 1979. Culture for *Clostridium difficile* in stools containing a cytotoxin neutralized by *Clostridium sordellii* antitoxin. J Clin Micro. 10: 860-864.



SN1161

REV. 04/09



 Manufactured By

 Meridian Bioscience, Inc.

 USA/Corporate Office

 3471 River Hills Drive

 Cincinnati, Ohio 45244

 Telephone: (513) 271-3700

 Orders/Customer Service:

 (800) 543-1980

 Technical Support Center:

 (800) 343-3858

 Information Fax:(513) 272-5432

 Ordering Fax:(513) 271-0124



 Authorized Representative

 Meridian Bioscience Europe

 Via dell'Industria, 7

 20020 Villa Cortese (MI)

 Italy

 Tel.: +39 0331 433636

 Fax: +39 0331 433616

 e-mail: info@mdeur.com

Meridian Bioscience Europe France

 Le Quadra

 455, Promenade des Anglais

 06299 Nice Cedex-3

 France

 Tel.: +33 (4) 93 18 72 10

 Fax: +33 (4) 93 18 72 11

 e-mail: info@meridianbioscience.fr

Meridian Bioscience Europe s.a. / n.v.

 Rue de l'Industrie 7

 1400 Nivelles

 Belgium

 Tel.: +32 (0) 67 89 59 59

 Fax: +32 (0) 67 89 59 58

 e-mail: info@mdeur.be

Meridian Bioscience Europe b.v.

 Helderheiweg 6

 5282 SN Boxtel

 The Netherlands

 Tel.: +31 (411) 621166






 Fax: +31 (411) 624841

 e-mail: meridian.info@planet.nl

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

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

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, Erläuterung der graphischen symbole)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Coniugue enzymatique / Coniugado enzimático / Enzymkonjugat
CE	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostika 98/79/EG.	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fisch konzentriertes Waschkonzentrat
		CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
		CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catalogo / Bestellnummer	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Mandatario nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	Contains sufficient for n tests / Contenuto sufficiente per n saggi / Contenu suffisant pour n tests / Contenido suficiente para n ensayos / Inhalt ausreichend für n Prüfungen		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Límites de temperatura / Temperaturbegrenzung	REAG	Reagent / Reagenti / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Solución tampón de lavado / Waschpuffer

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at 800-543-1980.