

# PREMIER® TOXINS A & B

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

REF 616096

IVD In vitro diagnostic medical device

### 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 colitis<sup>1</sup> and is the causative agent for virtually all cases of pseudomembranous colitis.<sup>2,3</sup> Although about 2% of normal healthy adults are colonized with *C. difficile*,<sup>4</sup> many patients acquire this organism through nosocomial infection.<sup>5</sup> Exposure to most antibiotics is thought to allow proliferation of toxigenic *C. difficile* by disrupting the normal intestinal flora.<sup>6</sup> Two toxins, toxin A and toxin B, are associated with disease caused by *C. difficile*.<sup>7</sup> These toxins are immunochemically and biologically distinct. Antiserum prepared against purified toxin A or toxin B does not cross-react with the other toxin.<sup>8</sup> Toxin A has been described as an enterotoxin and causes an increase in intestinal permeability with subsequent enteric fluid accumulation and diarrhea.<sup>9</sup> Toxin B is a potent cytotoxin which causes rounding of cells in culture.<sup>7,10</sup> In hamsters, toxin B is lethal when administered intravenously by itself or intragastrically if combined with sublethal doses of toxin A.<sup>11</sup> 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*.<sup>11,12</sup>

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,<sup>13</sup> 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.<sup>9</sup>

### 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

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

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

### 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".
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 pipetting.
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).

### HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

Refer to the SDS, available at [www.meridianbioscience.com](http://www.meridianbioscience.com) for Hazards and Precautionary Statements.

### 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.

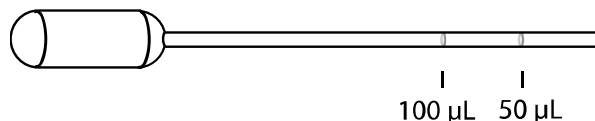
### REAGENT PREPARATION

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

### SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION (1:5 Sample Dilution)

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.<sup>13</sup> 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 for up to 8 hours at 2-8 C.

1. Add 200 µL of Sample Diluent to a clean test tube with dropper assembly (or equivalent).
2. Mix stool as thoroughly as possible prior to pipetting.
  - a. For liquid or semi-solid stool: Using the disposable transfer pipettes and measuring to the 1st calibration mark (50 µL), transfer 50 µL 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.
  - b. 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.
3. 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

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

1. 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).
  2. Using the original transfer pipette, draw up diluted stool to the 100 µL 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).
  3. Add 2 free-falling drops of Positive Control to the appropriate well. Add 100 µL (2nd mark on transfer pipette) of Negative Control (Sample Diluent) to the appropriate well.
  4. Add 1 free-falling drop of Enzyme Conjugate (50 µL) to all wells. Mix wells by firmly shaking/swirling the plate for 30 seconds.
  5. 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).
  6. Carefully, remove the plate sealer and wash wells (see REAGENT PREPARATION):
    - a. Dump plate contents firmly into a biohazard receptacle.
    - b. Bang the inverted plate on a clean stack of paper towels
    - c. 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.**

    - d. 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.
  7. Clean the underside of all wells with a lint free tissue.
  8. Add 2 free-falling drops of Substrate I (100 µL) to each well.
  9. Firmly shake/swirl the plate for 10-15 seconds then incubate for 10 minutes at 21-27 C.
  10. Add 2 free-falling drops of Stop Solution I (100 µL) 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.
11. Observe reactions:
    - a. Visual Determination – Read within 15 minutes after adding Stop Solution I.
    - b. 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

1. **Visual Reading**  
Negative = colorless to faint (barely visible) yellow  
Positive = definite yellow color
2. **Spectrophotometric Single Wavelength (450 nm)**  
Negative = OD<sub>450</sub> < 0.150  
Positive = OD<sub>450</sub> ≥ 0.150
3. **Spectrophotometric Dual Wavelength (450/630 nm)**  
Negative = OD<sub>450/630</sub> < 0.100  
Positive = OD<sub>450/630</sub> ≥ 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

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

- 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%<sup>1</sup> 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  $\geq 1.4$  ng/mL stool and toxin B at levels  $\geq 2.4$  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.<sup>14</sup>
- 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.<sup>15,16</sup>
- 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	88	13	465
Neg	9	461	7	465	95% CI
Relative Performance	Value	95% CI	Value	95% CI	
Co-Positivity	91.1%	93.8-95.8%	92.6%	84.5-97.0%	
Co-Negativity	97.7%	95.6-98.7%	97.3%	95.4-98.5%	
Agreement	96.5%	94.5-97.7%	98.5%	97.0-99.4%	
			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%

#### CROSSREACTIVITY

The specificity of Premier Toxins A&B was tested by following 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.<sup>13</sup>

#### 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)

#### ASSAY REACTIVITY

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%)

#### TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

The results of Premier Toxins A&B testing are not affected by blood, barium sulfate, metronidazole or vancomycin present in stool specimens.<sup>13</sup>

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), Vancomycine (2.8 µg/well), and Whole blood (50%).

#### ITALIANO

# PREMIER® TOXINS A & B

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

REF 616096

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

#### 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, colite<sup>1</sup> e colite pseudomembranosa.<sup>2-5</sup> Sebbene circa il 2% degli adulti sani siano colonizzati da *C. difficile*,<sup>6</sup> tuttavia molti pazienti acquisiscono questo organismo attraverso infezioni ospedaliere.<sup>7</sup> Si ritiene che il trattamento con antibiotici consenta la proliferazione di *C. difficile* tossinogenico, causando una diminuzione della normale flora batterica intestinale.<sup>8</sup> Due tossine, la Tossina A e la Tossina B, sono associate alla patologia causata da *C. difficile*.<sup>7</sup> 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.<sup>9</sup> La tossina A è un'enterotossina e causa un aumento della permeabilità intestinale con conseguente accumulo di fluidi a livello enterico e diarrea.<sup>9</sup> La tossina B è una potente citotossina che provoca l'arrotondamento di cellule in cultura.<sup>7,10</sup> 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.<sup>11</sup> Il contributo della tossina B nello sviluppo della malattia a livello gastrico non è ancora conosciuto. E' stato comunque ipotizzato che le due proteine possano agire sinergicamente *in vivo*.<sup>11,12</sup>

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,<sup>1,7</sup> 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.<sup>9</sup>

#### 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

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

- 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

#### 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\*

- Spruzzetta per i lavaggi
  - Pipettes e cilindro graduato per preparare la soluzione di lavaggio diluita (1X)
  - Bastoncini di legno
  - Carta assorbente
  - Termostato a 37 ± 2 C
  - Timer
  - Vortex
  - Contenitore per scarti con disinfettante (es. soluzione di candeggina al 10%)
  - Guanti usa-e-getta
  - OPZIONALE: Centrifuga
  - OPZIONALE: Aggitatore termostato Stat Fax™-2200\*, da utilizzare per ridurre il tempo di incubazione a 20 minuti\*
  - OPZIONALE: Lavatore di pastre 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

- Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- I reagenti del kit devono essere portati a temperatura ambiente (21-27 C) e mescolati con delicatezza prima dell'uso.
- Non portare alla bocca provette campioni o reagenti. Evitare il contatto con piccole abrasioni della pelle o con tessuti mucosi.
- Non fumare, mangiare o bere nelle zone dove si trattano campioni o reagenti.
- Indossare guanti usa-e-getta quando si maneggiano campioni e lavarsi le mani al termine delle analisi.
- Non scambiare pozzetti, Coniugato Enzimatico, Substrato I e Controllo Positivo tra lotti differenti (Il Diluente del Campione/Controllo Negativo, il Tampono di Lavaggio II (20X) e la Soluzione di Arresto I sono intercambiabili tra lotti differenti purché siano utilizzati entro la data di scadenza specifica).
- Non usare il kit dopo la data di scadenza.
- La Soluzione d'arresto I contiene acido fosforico 1M. Se si verifica un contatto con la pelle o tessuti mucosi lavarsi immediatamente con acqua.
- 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," secondo il Biosafety Level 2.
- Evitare spruzzi o la formazione di aerosol quando si trattano, diluiscono o trasferiscono campioni.
- Evitare la contaminazione batterica dei reagenti in quanto si potrebbero ottenere risultati errati.
- 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.
- 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.**
- 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.
- Il Controllo Positivo contiene Tossina A e Tossina B, inattivate. Comunque deve essere trattato come potenzialmente pericoloso.
- Mantenere i flaconi in posizione verticale per assicurare che venga dispensato un corretto volume di reattivo.
- Evitare che durante la dispensazione dei reagenti i flaconi vengano a contatto con i pozzetti.
- Richiudere i flaconi correttamente con gli appropriati tappi colorati.
- Tutti i reagenti forniti sono pronti all'uso alla concentrazione appropriata (ad eccezione del Tampono di lavaggio II (20X)). Non diluire i reagenti ulteriormente.
- Ogni deviazione dai tempi di incubazione indicati può far variare i valori di sensibilità e specificità e quindi dovrebbe essere evitata.
- Non utilizzare le strisce dei pozzetti se la busta di alluminio appare danneggiata (se contiene ad esempio segni e fori).

#### DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Fare riferimento alla SDS, disponibile sul sito [www.meridianbioscience.com](http://www.meridianbioscience.com) (US version) / [www.meridianbioscience.eu](http://www.meridianbioscience.eu) (EU version) per i rischi e i consigli di prudenza.

#### STABILITÀ E CONSERVAZIONE

- Conservare i reagenti del kit a 2-8 C. Riporli immediatamente nel frigorifero dopo l'uso.
- 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.
- Il Tampono di lavaggio II diluito può essere conservato a temperatura ambiente fino ad tre mesi.

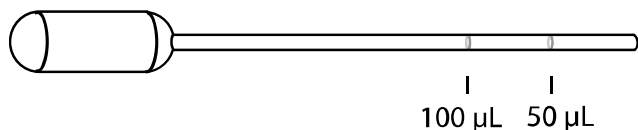
#### PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- 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.
- Preparare il contenitore di decontaminazione per lo scarto dei reagenti e materiali.
- Non lasciare asciugare i pozzetti tra una fase e l'altra.
- 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.
- Preparare il tampono di lavaggio 1X. Per esempio 5,0 mL di tampono di lavaggio II (20X) + 95,0 mL di acqua distillata o deionizzata sono sufficienti per lavare una striscia di pozzetti. Mettere il tampono in una spruzzetta pulita. Il tampono di lavaggio 1X può essere conservato a 21-27 C fino a 3 mesi.
- Per ciascuna analisi devono essere inclusi un Controllo Positivo ed un Controllo Negativo. Usare il Controllo Positivo come indicato. **NON DILUIRE.**
- Usare i fogli di plastica adesiva per coprire la micropiastre durante le fasi di incubazione. Tagliare la quantità necessaria e staccare la carta prima dell'uso.

#### RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE (diluizione 1:5 del campione)

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.<sup>13</sup> 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 fino a 8 ore a 2-8 C.

- Aspirare 200 µL di Diluente del campione e dispensare nelle provette di diluizione pulite.
- Mescolare bene le feci.**
  - 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.
  - 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.
- 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 sovrantante.



#### PROCEDURA DEL TEST

**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.

- 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**).
- 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).
- 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.
- Distribuire 1 goccia di Coniugato enzimatico (50 µL) in ciascun pozzetto. Mescolare bene, agitando delicatamente la piastra per 30 secondi.
- 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 aggitatore 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.**
- Con attenzione** togliere la pellicola adesiva e lavare i pozzetti (vedi Sezione **PREPARAZIONE DEI REAGENTI**):
  - Capovolgere i pozzetti, eliminando il contenuto in un contenitore con disinfettante.
  - Scuotere vigorosamente la piastra capovolta su carta assorbente pulita.
  - 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.**
- 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<sub>450</sub> < 0,150  
Positivo = OD<sub>450</sub> ≥ 0,150
- Letture spettrofotometrica a doppia lunghezza d'onda (450/630 nm)**  
Negativo = OD<sub>450/630</sub> < 0,100  
Positivo = OD<sub>450/630</sub> ≥ 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 test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.**

- 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, riazzerare 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.
- Se non si ottengono i risultati attesi con i Controlli, come prima operazione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale. (Italia +390331433636).
- 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%,<sup>1</sup> sebbene possano essere possibili tassi di positività diversi da questo valore.

#### LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- 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 inferiori ai limiti di rilevazione del kit. Il test Premier Toxins A&B rileva livelli di tossina A ≥ 1,4 ng/mL di feci e livelli di tossina B ≥ 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.<sup>14</sup>
- 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*.<sup>15,16</sup>
- Benché 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 positive 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	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%	98,1%	80,6-93,7%	
			98,5%	97,0-99,4%	
			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 concordanza erano positivi al test di citotossicità e un altro campione era positivo all'esame colturale. Nessuno dei 9 campioni positivi al test EIA della concordanza 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
Assorbimento 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%

## CROSS-REATTIVITÀ

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-reattire 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 positivi.<sup>13</sup>

### 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)

## REATTIVITÀ ANALITICA

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-reatzioni 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%)

## ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

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

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%).

## FRANÇAIS

# PREMIER® TOXINS A & B

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

REF 616096

IVD Dispositif médical de diagnostic in vitro

## 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 colites<sup>1</sup> associées à un traitement aux antibiotiques, et est l'agent responsable de pratiquement tous les cas de colites pseudomembraneuses.<sup>2,3</sup> Bien qu'environ 2% des adultes en bonne santé soient colonisés par *C. difficile*,<sup>4</sup> beaucoup de patients contractent ce microorganisme lors d'infections nosocomiales.<sup>5</sup> Il semble que la plupart des traitements aux antibiotiques permettent la prolifération de la souche *C. difficile* toxinogène en perturbant la flore intestinale normale.<sup>6</sup> Deux toxines, la toxine A et la toxine B, sont associées aux infections induites par *C. difficile*.<sup>7</sup> 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.<sup>8</sup> 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.<sup>9</sup> La toxine B est une cytotoxine potentielle qui cause un arrondissement des cellules en cultures.<sup>7,10</sup> 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.<sup>11</sup> 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.<sup>11,12</sup>

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,<sup>1,7</sup> 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.<sup>9</sup>

## 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 scélables 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'une acide (solution d'arrêt (Premier Stop Solution I)) transformera la coloration bleue en jaune.

## MATERIEL FOURNI

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

- Premier Toxins A&B Micropuits recouverts d'anticorps - Micropuits scélables 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 thimérosal (0,02%) comme conservateurs.
- Premier Toxins A&B Diluant pour d'échantillon/Contrôle négatif - Solution protéique tamponnée contenant de la gentamicine et du thimérosal (0,02%) comme conservateurs.
- Solution de lavage concentrée 20X (Premier 20X Wash Buffer II) - Tampon de lavage concentré contenant du thimérosal (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 thimérosal (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

## MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Tubes à essai pour la dilution des échantillons
- Eau distillée ou déionisée
- 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
- Conteneur 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".

- Eviter les éclaboussures ou la formation de gouttelettes en suspension lors de la manipulation, de la dilution ou du transfert des échantillons.
- Eviter 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 infectueux.
- Tenir les flacons en position verticale pour garantir un calibrage correct du dépôt.
- Eviter que les embouts des flacons ne viennent en contact avec les micropuits.
- Remplacer 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).

#### DANGER ET MISES EN GARDE

Pour les dangers et les précautions à prendre, se référer à la fiche de sécurité, disponible sur le site web de Meridian Bioscience. [[www.meridianbioscience.com](http://www.meridianbioscience.com)] (US version) / [[www.meridianbioscience.eu](http://www.meridianbioscience.eu)] (EU version)]

#### CONSERVATION DES REACTIFS

- Conserver les réactifs du coffret à une température comprise entre 2 et 8 C. Remplacer les réactifs le plus rapidement possible au réfrigérateur après utilisation.
- Laisser les micropuits revenir à température ambiante dans leur emballage pour éviter toute condensation. Remplacer 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.

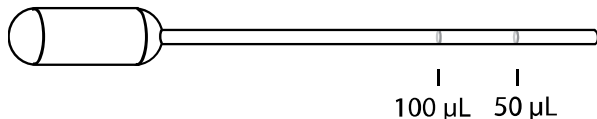
#### PREPARATION DES REACTIFS

- Amener à température ambiante (21-27 C) le coffret et les micropuits dans leur sac d'emballage avant utilisation. Remplacer immédiatement le coffret à 2-8 C après utilisation.
- Préparer la vaisselle de décontamination pour l'élimination des réactifs et du matériel.
- Eviter 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.

#### PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS (une dilution des échantillons au 1:5)

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.<sup>13</sup> Les congélations et décongelations répétées des échantillons doivent être évitées. Utiliser uniquement le Diluant d'Echantillon fourni dans ce coffret pour la dilution des prélèvements. Les prélèvements peuvent être conservés dilués dans un tube fermé avec le diluant d'échantillon 8 heures durant à 2-8 C.

- 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 surageant.



#### PROCEDURE DU TEST

**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/diluante 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 incuber la plaque pendant 50 minutes à 35-39 C. **Les laboratoires équipés d'un agitateur de plaque chauffant (Stat Fax™-2200) peuvent incuber 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 "PREPARATION 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. Eviter 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 incuber 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).

#### INTERPRETATION 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 = DO<sub>450</sub> < 0,150  
Positif = DO<sub>450</sub> ≥ 0,150
- Lecture en spectrophotométrie à double longueur d'onde (450/630 nm)**  
Négatif = DO<sub>450/630</sub> < 0,100  
Positif = DO<sub>450/630</sub> ≥ 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

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

- 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 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 déceler 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%,<sup>1</sup> bien que des conditions différentes puissent donner des taux de positivité en dehors de cet intervalle.

#### LIMITES DU TEST

- 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 ≥ 1,4 ng/mL de selles et la toxine B à un taux de ≥ 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.<sup>14</sup>
- 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.<sup>15,16</sup>
- 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 cytotoxicité 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 toxigénique 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.





## REACTIVIDAD CRUZADA

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.<sup>13</sup>

### 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>Campylobacter 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)

## REACTIVIDAD DE LA PRUEBA

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%)

## PRUEBAS PARA 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.<sup>13</sup>

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%).

## DEUTSCH

# PREMIER® TOXINS A & B

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

REF 616096

IVD In-vitro-Diagnostikum

### 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 Kolitis<sup>1</sup> und der Auslöser von praktisch allen Fällen pseudomembranöser Kolitis.<sup>2, 3</sup> Obwohl rund 2% aller gesunden Erwachsenen mit *C. difficile*<sup>4</sup> besiedelt sind, erwerben viele Patienten diesen Organismus durch nosokomiale Infektionen.<sup>5</sup> Den meisten Antibiotika wird eine Förderung der Proliferation des Toxin-Bildners *C. difficile* durch die Zerstörung der natürlichen Darmflora zugeschrieben.<sup>6</sup> Zwei Toxine, Toxin A und Toxin B, werden mit der Erkrankung, die durch *C. difficile* ausgelöst wird, in Verbindung gebracht.<sup>7</sup> Diese Toxine unterscheiden sich immunchemisch und biologisch. Das Antiserum gegen reines Toxin A bzw. Toxin B zeigt keine Kreuzreaktion mit dem jeweils anderen Toxin.<sup>8</sup> Toxin A wird als Enterotoxin beschrieben, das eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität mit nachfolgender Ansammlung von Darmflüssigkeit und Diarrhoe auslöst.<sup>9</sup> Toxin B ist ein starkes Zytotoxin, das in Zellkulturen eine Abtötung der Zellen verursacht.<sup>10</sup> Bei Hamstern ist das Toxin B tödlich, wenn es entweder allein intravenös oder in Kombination mit sublethalen Dosen von Toxin A intragastral verabreicht wird.<sup>11</sup> 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.<sup>11, 12</sup>

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,<sup>1, 7</sup> 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.<sup>9</sup>

### BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

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 (horsradish 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.

### REAGENZIENTHALTENE MATERIALIEN

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

- Premier Toxins A&B Antikörper-beschichtete Kavitäten** - Plastik-Kavitäten, einzeln abbrechbar, beschichtet mit monoklonalen Maus anti-Toxin A-Antikörpern und polyklonalen Ziege anti-Toxin B-Antikörpern.
- Premier Toxins A&B Positivkontrolle** - inaktivierte Toxine A und B in einer gepufferten Proteinlösung konserviert mit Gentamycin und Thimerosal (0,02%)
- Premier Toxins A&B Probenverdünnungspuffer/Negativkontrolle** - gepufferte Proteinlösung konserviert mit Gentamycin und Thimerosal (0,02%)
- 20 fach Waschpuffer (Premier 20X Wash Buffer II)** - konzentrierter Waschpuffer konserviert mit 0,2% Thimerosal

- 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
- Substrat (Premier Substrate I)** - Gepufferte Lösung mit Peroxid und Tetramethylbenzidin
- Stopplösung (Premier Stop Solution I)** - 1M Phosphorsäure. VORSICHT: Hautkontakt vermeiden. Wenn doch Kontakt auftritt, mit Wasser spülen.
- Transferpipetten für Proben**
- Klebefolien zur Versiegelung der Streifen**

### ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES ABER NICHT ENTHALTENE MATERIAL

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

- Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Die Reagenzien des Testkits sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (21-27 C) gebracht werden und vorsichtig gemischt werden.
- Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen mit den Proben oder den Test-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Einmalhandschuhe während des Umgangs mit Proben tragen und danach die Hände sorgfältig waschen.
- 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).
- Den Testkit nicht nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums, das auf dem Etikett angegeben ist, verwenden.
- Die Stopplösung I enthält 1M Phosphorsäure. Falls ein Kontakt mit Haut oder Schleimhaut auftritt, sofort mit Wasser spülen.
- Patientenproben können infektiös sein und sollten nach den Biosafety Level 2 – Richtlinien - wie im CDC/NIH Handbuch "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories," beschrieben - gehandhabt werden.
- Bei der Handhabung, dem Verdünnen oder dem Transfer von Proben jedes Verspritzen oder Zerstäuben vermeiden.
- Mikrobielle Verunreinigung der Reagenzien vermeiden, dies kann zu falschen Ergebnissen führen.
- 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.
- Alle Stuhlproben müssen - unabhängig von der Konsistenz - sorgfältig gemischt werden, um eine repräsentative Probe pipettieren zu können.**
- Die Reagenzienkonzentrationen, die Inkubationszeiten und Temperaturen wurden im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität optimiert. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn diese Vorgaben eingehalten werden.
- Die Positivkontrolle enthält die inaktivierten Toxine A und B. Sie sollte dennoch als möglicherweise infektiös gehandhabt werden
- Alle Flaschen senkrecht halten, um eine sorgfältige Zugabe von Tropfen der richtigen Größe zu erzielen.
- Mit den Flaschenspitzen die Mikrotiterkavitäten nicht berühren.
- Die Flaschen mit den Deckeln der richtigen Farbe wiederverschließen.
- Alle Reagenzien werden in der gebrauchsfertigen Konzentration (mit Ausnahme des 20fach konzentrierten Waschpuffers II) geliefert. Nicht verdünnen.
- Jede Unter- und Überschreitung der vorgegebenen Inkubationszeiten kann die Sensitivität und Spezifität beeinträchtigen und sollte vermieden werden.
- Mikrotiterkavitäten nicht verwenden wenn der Folienbeutel beschädigt ist. (dh. Löcher oder Einstich).

### GEFÄHRDUNGEN UND SICHERHEITSHINWEISE

Für weitere Informationen zu den Gefahren- und Sicherheitshinweisen, beziehen Sie sich auf die SDS, die unter folgendem Link verfügbar sind: [www.meridianbioscience.com](http://www.meridianbioscience.com) (US version) / [www.meridianbioscience.eu](http://www.meridianbioscience.eu) (EU version).

### HALTBARKEIT UND LAGERUNG

- Alle Testkit-Reagenzien bei 2-8 C lagern. Den Kit sofort nach Gebrauch wieder in den Kühlschrank legen.
- 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.
- Der verdünnte Arbeits-Waschpuffer (Premier 20X Wash Buffer II) kann bei Raumtemperatur aufbewahrt und bis zu drei Monate lang verwendet werden.

### VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- 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.
- Ein Desinfektionsgefäß für die Entsorgung von Reagenzien und anderen Verbrauchsmaterialien bereitstellen.
- 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 Klebefolien zum Verschließen der EIA-Platte während der Inkubationsschritte. Vor Gebrauch passend zurechtschneiden, dann den Papierrücken entfernen.

### PROBENNAHME UND VORBEREITUNG (1:5 Probenverdünnung)

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.<sup>13</sup> 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 bis zu 8 Stunden bei 2-8 C aufbewahrt werden.

- 200 µL des Probenverdünnungspuffers mit dem Tropfer (oder Vergleichbarem) in ein sauberes Reagenzröhrchen füllen.





## ASSAY-REAKTIVITÄT

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%)

## STÖRSUBSTANZEN-TESTS

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

Die folgenden Substanzen beeinflussen 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%).

## REFERENCES

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



SN11161

REV. 01/15

 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 S. r. l. Via dell'Industria, 7 20020 Villa Cortese, Milano ITALY Tel: +39 0331 43 36 36 Fax: +39 0331 43 36 16 Email: info@meridianbioscience.eu WEB: www.meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe s.a./n.v.  
 2 Avenue du Japon - 1420 Braine l'Alleud  
 BELGIUM  
 Tel: +32 (0) 67 89 59 59  
 Fax: +32 (0) 67 89 59 58  
 Email: info.bn@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe France  
 34 rue de Ponthieu - 75008 Paris  
 FRANCE  
 Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40  
 Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10  
 Email: info.fr@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe b.v.  
 Postbus 301 - 5460 AH Veghel  
 NETHERLANDS  
 Tel: +31 (0) 411 62 11 66  
 Fax: +31 (0) 411 62 48 41  
 Email: info.bn@meridianbioscience.eu

## INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

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

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

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	<b>CONTROL +</b>	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
<b>LOT</b>	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	<b>CONTROL -</b>	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo medico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	<b>EC REP</b>	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	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	<b>SMP   PREP   DIL   SPE</b>	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenzubereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
<b>REF</b>	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence ou catalogue / Numero de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	<b>BUF RXN</b>	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Solo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	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	<b>SOLN   STOP</b>	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	<b>CONJ   ENZ</b>	Enzyme Conjugate / Conjugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
<b>SN</b>	Serial number / Numero di serie / Numero de série / Numero de serie / Seriennummer	<b>CONTROL</b>	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
<b>TEST</b>	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	<b>REAG</b>	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	<b>BUF   WASH</b>	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
<b>BUF</b>	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
<b>CONJ</b>	Conjugate / Conjugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	<b>DIL   SPE</b>	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
<b>SUBS</b>	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	<b>BUF   WASH   20X</b>	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
		<b>DET   REAG</b>	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Détection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz

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.