immunocard®
Toxins A&B

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

REF **712050** IVD **Rx Only**

INTENDED USE
Immunocard Toxins A & B is a rapid, qualitative, horizontal-flow enzyme immunoassay (EIA) for detecting *Clostridium difficile* Toxins A and B in human stool. This assay is used as an aid in the diagnosis of *C. difficile*-associated disease.

In the US, Immunocard Toxins A & B is not intended for point-of-care use. The device is intended for moderately complex laboratories. In Canada, this device is not intended for point-of-care use.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST
Toxigenic *Clostridium difficile* is the leading cause of nosocomial infectious diarrhea in developed countries. An estimated 300,000 cases of *C. difficile* associated disease (CDAD) are seen per year in U.S. hospitals alone.[1, 2] *Clostridium difficile* is the etiologic agent in approximately 25% of all cases of antibiotic-associated diarrhea. Virtually any antibiotic can predispose a patient to CDAD. The clinical presentation for CDAD ranges from asymptomatic colonization to life-threatening pseudomembranous colitis and toxic megacolon.[2] Most pathogenic strains of *C. difficile* produce two biologically and immunologically distinct toxins: toxin A (enterotoxin) and toxin B (cytotoxin). Toxin A was once thought to be responsible for most of the pathology seen in human CDAD until reports of clinically relevant disease caused by strains of *C. difficile* that produce only toxin B began to appear in the late 1990's.[1] The most accurate assay overall for the detection of *C. difficile* is the cytotoxin assay, however the method requires tissue culture facilities, 48-72 hour incubation and is not standardized.[2] The use of a rapid test such as Immunocard Toxins A & B enables the physician to verify infection quickly, begin proper treatment and to initiate enteric isolation precautions in a hospital setting.[2]

BIOLOGICAL PRINCIPLES
Immunocard Toxins A & B consists of a membrane held in a plastic frame with two sample ports and two reaction ports. The membrane carries immobilized antibodies to toxins A and B. The Enzyme Conjugate Reagent consists of antibodies to toxins A and B coupled to horseradish peroxidase. To perform the test, patient stool sample is diluted with Sample Diluent and Enzyme Conjugate and the mixture is incubated for five minutes to 24 hours. During the incubation, molecules of toxin, if present, are bound to the anti-toxin antibodies of the conjugate. Following incubation, an aliquot of the mixture is added to each of the two sample ports and the test is incubated for an additional five minutes at 20-26 C. During the second incubation the toxin-conjugate complex is separated from particulate matter as the fluid portion of the sample flows through the membrane to the TEST and CONTROL reaction ports. The toxin-conjugate complexes are then captured at the TEST reaction port by immobilized antitoxin in the reaction membrane. (The second of the two reaction ports serves as an internal control.) Both reaction ports are subsequently washed with Immunocard Wash Buffer I to reduce interference by contaminating proteins before Immunocard Substrate I is added. The reaction ports are incubated for an additional five minutes during which time the Enzyme Conjugate modifies the Immunocard Substrate I. The result is the appearance of a blue color. Reactions are read visually. Development of a blue color in the TEST reaction port indicates a positive test. In the CONTROL port, the anti-toxin antibodies of the conjugate bind directly to the immobilized toxin. The appearance of blue in the CONTROL reaction port indicates that sample was added, that reagents were active at the time of use and that proper sample migration occurred.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED
The maximum number of tests obtained from this kit is listed on the outer box.
1. **Immunocard Toxins A & B Test Card:** A membrane pad housed in a plastic frame and enclosed in a foil pouch with a desiccant. The pad carries immobilized monoclonal anti-toxin A and goat polyclonal anti-toxin B at the TEST reaction port and *C. difficile* toxin at the CONTROL reaction port. Store the test cards at 2-8 C when not in use.
2. **Sample Diluent*:** A buffered protein solution containing gentamicin and thimerosal (0.02%) as a preservative. Store at 2-8 C when not in use.
3. **Positive Control*:** Inactivated crude *C. difficile* toxin in a buffered solution containing thimerosal (0.02%) as a preservative. The reagent is supplied ready for use. Store at 2-8 C when not in use.
4. **Enzyme Conjugate*:** A blend of goat polyclonal antibodies to toxins A and B conjugated to horseradish peroxidase and suspended in a buffered protein solution containing gentamicin and thimerosal (0.02%). Store at 2-8 C when not in use.
5. **Immunocard Wash Buffer I*:** A buffered solution containing thimerosal (0.01%) as a preservative. Store at 2-8 C when not in use.
6. **Immunocard Substrate I*:** A buffered solution containing tetramethyl-benzidine and peroxide. Store at 2-8 C when not in use.
7. Plastic transfer pipettes with measuring marks for 25 µL and 150 µL.

* In a plastic dropper vial. Use as supplied.

MATERIALS NOT PROVIDED
1. Disposable latex gloves that should be used during the handling of the fecal samples as they are considered potentially biologically hazardous material
2. Vortex for suspending of the stool sample in the Sample Diluent
3. Interval timer
4. Applicator sticks
5. Small test tubes, such as 10 x 75 mm or 12 x 75 mm

PRECAUTIONS
1. **All reagents are for in vitro diagnostic use only.**
2. **Do not store at temperatures above 2-8 C. Do not freeze.**
3. **Do not deviate from the established insert method or falsely positive or falsely negative results may occur.**
4. **Some patient samples contain infectious agents; therefore all patient samples should be handled and disposed of as if they are biologically hazardous.**
5. **DO NOT interchange the Test Card, Enzyme Conjugate and Positive Control reagents from different kit lot numbers. The other reagents (Sample Diluent, Immunocard Wash Buffer I, Immunocard Substrate I) can be interchanged between kits providing the reagents are within their expiration periods. Do not use any reagent beyond its labeled expiration date.**
6. **All stool samples must be mixed thoroughly before testing, regardless of consistency, to ensure a representative sample prior to testing.**
7. **Failure to bring samples and reagents to room temperature (20-26 C) before testing may decrease assay sensitivity.**
8. **Inspect Test Cards before removing the foil pouch. Do not use Test Cards that have holes in the foil pouch or where the pouch has not been completely sealed. Do not use Test Cards where the desiccant indicator has changed from blue to pink. False-negative reactions may result due to deterioration of the improperly stored Test Cards.**
9. **Do not use the Sample Diluent or Positive Control if they are discolored or turbid. Discoloration or turbidity may be a sign of microbial contamination. It is normal for the Immunocard Wash Buffer I to appear slightly turbid.**
10. **The Immunocard Substrate I is light sensitive and should be stored in the dark. The appearance of the reagent should be clear and colorless. If the reagent exhibits any color or is turbid it should be discarded.**
11. **Hold reagent vials vertically when dispensing drops to ensure consistent drop size and delivery.**

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

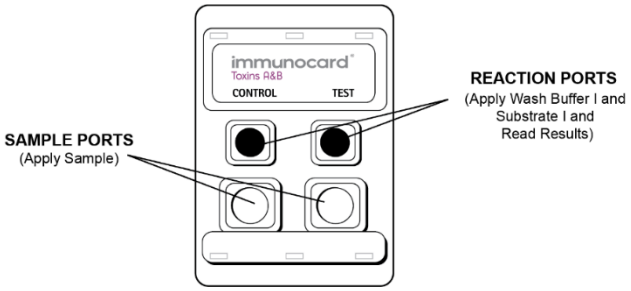
 ImmunoCard Wash Buffer I	**Signal word** Danger Contains Imidazole **Hazard statements** H315 - Causes skin irritation H319 - Causes serious eye irritation H360D - May damage the unborn child **Precautionary Statements - EU (§28, 1272/2008)** P321 - Specific treatment (see Section 4 on this label). P264 - Wash face, hands and any exposed skin thoroughly after handling. P280 - Wear eye protection/ face protection. P337 + P313 - If eye irritation persists: Get medical advice/attention. P201 - Obtain special instructions before use. P202 - Do not handle until all safety precautions have been read and understood. P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P308 + P313 - IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

The stool sample should be transported in an airtight container and stored at 2-8 C until tested. The sample should be tested as soon as possible, but may be held up to four days at 2-8 C prior to testing. If testing cannot be performed within this time frame, samples should be frozen immediately on receipt and stored frozen (≤ -20 C) until tested. Samples that are frozen and thawed up to three times are acceptable for use.

PROCEDURAL NOTES

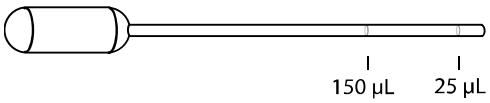
1. The Immunocard test card format is diagrammed below:



2. Batch processing of any number of samples or controls is possible provided that, **for each card**, the appropriate steps, sequence of reagent addition, incubation (wait) and result reading times are maintained. Each procedural step should be completed with each sample before the next step is started.
3. The **Control** (left) side of each card provides an internal control for each sample. This tests the individual sample for sufficient dilution and reagent performance.

TEST PROCEDURE

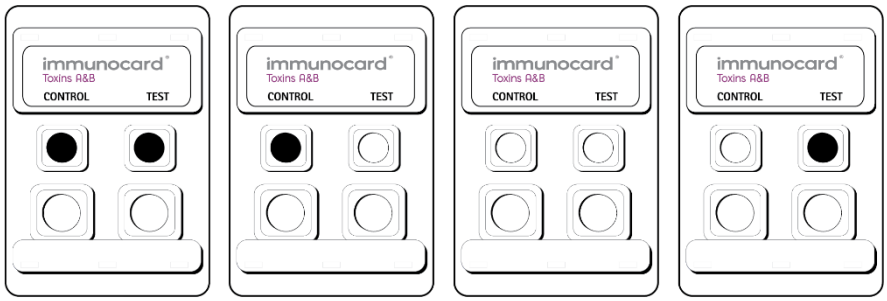
1. Bring all test cards, reagents and samples to room temperature (20-26 C) before testing. Remove the reagents from the kit box to warm. **Reagents may take up to 60 minutes to warm following refrigeration. RETURN TO 2-8 C IMMEDIATELY AFTER USE.**
2. Label 1 test tube for each patient sample to be tested.
3. Add 200 µL of Sample Diluent to a test tube using the dropper in the bottle.
4. Add 3 drops of Enzyme Conjugate (150 µL) to each tube.
5. Immediately add stool sample or control as follows:
   a. **Liquid/Semi-solid stools** – Mix the stool sample thoroughly. Using a clean transfer pipette (included with the kit), draw the stool to the first mark from the end of the tip (25 µL). Dispense the stool into the Diluent/Conjugate mixture. Use the same pipette to mix the stool by gently aspirating, then dispensing the suspension several times. Vortex the final mixture for 10 seconds. Leave the pipette in the tube for use later in the test.*



   b. **Formed/Solid stools** – Mix the stool sample thoroughly. Using a wooden applicator stick, transfer a small portion (approximately 2 mm diameter) of the stool into the Diluent/Conjugate mixture. Emulsify the sample using the applicator stick, and then thoroughly mix with a vortex for 10 seconds. Add a pipette to the tube and leave for later use in testing.*
   c. **Optional control:** Using the container droppers, add 1 drop of Positive Control or Negative Control (Sample Diluent) (provided with the kit) to the Diluent/Conjugate mixture. Vortex 10 seconds. Add a pipette to the tube and leave for later testing.

   ***NOTE: The transfer of too little sample, or failure to mix and suspend the sample in the Diluent/Conjugate mixture completely may result in a false-negative test result. Addition of too much stool sample may cause invalid results due to restricted sample flow.**
6. Let each diluted sample stand for 5 minutes to 24 hours at 20-26 C. Seal tube containing diluted sample or control if incubating beyond 6 minutes.
7. Use 1 Immunocard Test Card for each sample or control. When ready to perform testing, remove the Immunocard Test Card from its foil pouch. Discard the pouch and desiccant. Label the device with the name of the patient or the control.
8. Vortex each sample or control for 10 seconds before use.
9. Add 150 µL of each diluted sample or control to each of the 2 sample ports on 1 test card (150 µL represents the second mark on the transfer pipette).
10. Incubate for 5 ± 1 minutes at 20-26 C. NOTE: At the end of incubation both reaction ports must appear completely wet. If either reaction port is not completely wet, discard the Test Card and repeat the procedure. Proceed with testing if sample remains in the sample ports yet both reaction ports are completely wetted.
11. Hold the Immunocard Wash Buffer I vial vertically and dispense exactly 3 drops to each of the reaction ports.
12. When the Immunocard Wash Buffer I has been completely absorbed, hold the vial vertically and add exactly 3 drops of Immunocard Substrate I.
13. Incubate the test card at 20-26 C for 5 minutes.
14. **Visually read the results of each card within 30 seconds of the end of incubation.**

INTERPRETATION OF RESULTS



READ ONLY UPPER REACTION PORTS TO INTERPRET RESULTS

NOTE: Disregard color development in the sample ports. The color of the sample ports is not evaluated during testing.

Positive test result: Blue color in the TEST (upper right) and CONTROL (upper left) reaction ports. The intensity of the blue color of the TEST port may vary from the bottom to the top of port. A positive test result indicates that toxin A and/or B is/are present in the sample. PLEASE NOTE: The TEST port may appear less blue than the CONTROL port.

Negative test result: Blue color in the CONTROL reaction (upper left) port only. The TEST reaction (upper right) port should be colorless. (The wetting of the membrane may make the TEST port appear to be slightly grey.) A negative test result indicates that *C. difficile* toxins are absent or below the limit of detection of the assay. Occasionally the TEST PORT (upper right) may show evidence of a hint of blue color in the left or right side of the port, with the rest of the port colorless. This should be considered a negative test result.

Invalid test results:
1. No detectable blue color in the CONTROL reaction port. Failure of the CONTROL invalidates any test result. The invalid test may be due to the failure of a reagent or the Test Card to perform properly, failure to add sample, failure of the sample to migrate, or failure to dilute the sample correctly leading to over inoculation of the Test Card. Samples with extremely high levels of toxins may also present with a positive TEST yet negative CONTROL port.
2. A blue ring on the plastic frame surrounding the TEST (upper right) port during the test procedure.
   When invalid results are obtained, redilute the sample and repeat the test on a new card.

QUALITY CONTROL

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

Each Test Card contains an internal control. The appearance of a blue color in the CONTROL reaction port verifies the assay was active at the time of use, that sample was added and that there was adequate migration of the sample.

The reactivity of each new lot and each new shipment of the Immunocard Toxin A & B should be verified on receipt or before use. Positive Control reagent is supplied with the kit. The control is used to verify the reactivity of the other reagents associated with the assay, and is not intended to ensure precision at the analytical assay cut-off. Sample Diluent is used for the Negative Control. Additional tests can be performed with the controls to meet the requirements of local, state and/or federal regulations and/or accrediting organizations. The results expected with the controls are described in the section on INTERPRETATION OF RESULTS. The Test Card should not be used if control tests do not produce the correct results. Proper results obtained with the Control Port, Positive Control and Negative Control (Sample Diluent) serve as indicators that the test was performed correctly, that the antibodies embedded in the membrane and the Enzyme Conjugate are active at the time of testing, and that the membrane supports proper sample flow. Failure of the internal and external control to produce the expected results suggests the test was not performed correctly (i.e., incorrect volume of reagents added; incorrect incubation temperature or times used or that reagents were not brought to room temperature prior to testing). **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.**

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 diseases is 15-20%, although different facilities may find positive rates above or below this range.[2, 3, 5] A positive result in an uninfected patient is not expected.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE
1. The test is qualitative and no quantitative interpretation should be made with respect to the intensity of the color when reporting the result.
2. A positive test confirms the presence of toxins A and/or B only. A physician must use the test results in conjunction with other diagnostic procedures and the patient's clinical condition to establish a diagnosis of *C. difficile*-associated disease. The levels of toxin do not always correlate directly with the presence or severity of disease.[1]
3. Isolates of *C. sordellii* may react with this test due to the immunological identity of the *C. sordellii* toxins.[3]
4. The performance of samples from pediatric patients has not been evaluated.
5. Two distinct groups have been identified that can harbor *C. difficile* asymptomatically at very high rates. Colonization rates of up to 50% and higher have been reported in infants[3] and rates of up to 32% in cystic fibrosis patients.[4]
6. 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 sample 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

Comparative studies

Three independent laboratories tested samples with Immunocard Toxins A & B and the standard cell cytotoxicity assay with neutralization. The results of the parallel tests are given below.

Prospective Samples	**ICTAB**			
	Pos	**Neg**	**Total**	
Cytotoxin Pos (Std)	67	5	72	
Cytotoxin Neg (Std)	2	176	178	
Total	69	181	250	
				95% CI
Clinical sensitivity	67/72 (93.1%)			87.1-98.9%
Clinical specificity	176/178 (98.9%)			97.6-100%
Predictive value positive test	67/69 (97.1%)			92.9-100%
Predictive value negative test	176/181 (97.2%)			94.5-99.5%
Retrospective Samples	**ICTAB**			
	Pos	**Neg**	**Total**	
Cytotoxin Pos (Std)	33	0	33	
Cytotoxin Neg (Std)	5	303	308	
Total	38	303	341	
				95% CI
Clinical sensitivity	33/33 (100%)			N/A
Clinical specificity	303/308 (98.4%)			96.4-99.6%
Predictive value positive test	33/38 (86.8%)			76.2-97.8%
Predictive value negative test	303/303 (100%)			N/A

ANALYTICAL SENSITIVITY

The lower limit of detection of this assay is approximately 3 ng of toxin A and 3 ng of toxin B per mL of stool. This limit does not vary from solid to liquid/semi-solid stool.

REPRODUCIBILITY

The reproducibility of Immunocard Toxins A & B was determined with known negative (n=2) and positive (n=6) samples that were coded and randomly sorted to prevent their identification during testing. Two of the positive samples were near the limit of detection for the assay. Three laboratories tested the samples on three consecutive days. The samples produced the expected results 100% of the time.

ANALYTICAL SPECIFICITY

Stool samples inoculated with the following microbial agents (to a final sample concentration of ≥ 1 x 10^8 organisms/mL) do not react with Immunocard Toxins A & B: Adenovirus 40, Adenovirus 41, *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, nontoxigenic C. difficile* (10 strains), *Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* strain 9714, *Clostridium sporogenes, Enterobacter cloacae, Escherichia coli* (four strains including two O157:H7 strains), *Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Porphyromonas asaccharolytica, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa,* Rotavirus, *Salmonella typhimurium, Serratia liquefaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* Cowan I, *Staphylococcus epidermidis, Streptococcus faecalis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica.* The only non-*C. difficile* microorganism reactive with Immunocard Toxins A & B was *C. sordellii* VPI 9048. This strain produces toxin A and B homologs HT and LT.

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

The following substances had no effect on test results when present in stool in the concentrations indicated: fecal fat (4.8% w/v), whole blood (40% v/v), mucin (3.5% w/v), Metronidazole (0.25% w/v), Vancomycin (0.25% w/v), barium sulfate (5% w/v), Imodium AD® (5% w/v), Kaopectate® Caplets (5 mg/mL), Pepto Bismol® (5% v/v).

Additional information regarding the performance characteristics of this product can be obtained by contacting Meridian's Technical Support Department at (800) 343-3858 for assistance (USA) or your local distributor.

ITALIANO

immunocard®
Toxins A&B

Test immunoenzimatico rapido per la ricerca delle tossine A e B di *Clostridium difficile* in campioni fecali

REF **712050** IVD **Rx Only**

FINALITÀ D'USO
Immunocard Toxins A & B è un test rapido immunoenzimatico (EIA), a flusso laterale, qualitativo, per la ricerca delle tossine A e B del *Clostridium difficile* in campioni fecali. Il test è da utilizzarsi come supporto nella diagnosi di patologie associate a *C.difficile*.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST
Il *Clostridium difficile* tossigenico è la prima causa di diarrea nosocomiale infettiva nei paesi sviluppati. Solo negli Stati Uniti si stimano, ogni anno, 300,000 casi ospedalieri di malattia associata al *C. difficile.*[1, 2] *Clostridium difficile* rappresenta l'agente eziologico in circa il 25% di tutti i casi di diarrea associata ad antibiotici. Praticamente ogni antibiotico può predisporre un paziente alla malattia associata al *C. difficile.* La presentazione clinica di tale patologia può variare da una colonizzazione asintomatica ad una colite pseudomembranosa e megacolon tossico, i quali mettono in serio pericolo la vita del paziente.[2] La maggior parte dei ceppi patogeni di *C. difficile* producono due tossine biologicamente e immunologicamente distinte: la tossina A (enterotossina) e la tossina B (citotossina). In passato si riteneva che la tossina A fosse responsabile della maggior parte delle patologie riscontrate in malattie associate al *C. difficile* nell'uomo, finchè nel 1990 sono state riportate malattie clinicamente pertinenti causate da ceppi di *C. difficile* produttori della sola tossina B.[1] Il test più accurato per la ricerca della tossina B di *C. difficile* è il test di citotossicità, che però richiede strutture per le colture cellulari, 48-72 ore d'incubazione ed inoltre non è standardizzato.[2] L'uso di un test rapido come l'Immunocard Toxins A & B permette al medico di verificare rapidamente l'infezione, cominciare il corretto trattamento e avviare le precauzioni d'isolamento enterico all'interno dell'ambiente ospedaliero.[2]

PRINCIPI BIOLOGICI
Il dispositivo test Immunocard Toxins A & B è costituito da una membrana contenuta in una cassetta di plastica con due pozzetti per il campione e altrettanti pozzetti di reazione. Sulla membrana sono immobilizzati degli anticorpi specifici per le tossine A e B. Il Coniugato Enzimatico è un reagente costituito da anticorpi specifici per le tossine A e B coniugati con perossidasi di rafano. Per eseguire il test, un campione fecale del paziente viene diluito con il diluente del campione ed il Coniugato Enzimatico; questa miscela viene incubata da un minimo di cinque minuti fino ad un massimo di 24 ore. Un'aliquota ben mescolata della soluzione viene aggiunta a ciascuno dei pozzetti del campione. Il test è incubato per altri cinque minuti a 20-26 C. Durante la seconda incubazione le molecole delle tossine, se presenti, si legano agli anticorpi anti-tossine del coniugato. In secondo luogo, il complesso tossina-coniugato si separa dalla sospensione fecale e fluisce attraverso la membrana verso i pozzetti di reazione TEST e CONTROL. Infine, il complesso tossina-coniugato è catturato nel pozzetto di reazione TEST da anticorpi anti-tossine immobilizzati sulla membrana nel pozzetto di reazione (Il secondo dei due pozzetti di reazione, chiamato CONTROL, serve da controllo interno). Entrambi i pozzetti di reazione sono successivamente lavati con la Immunocard Soluzione di Lavaggio I per ridurre le interferenze di proteine contaminanti prima dell'aggiunta del Immunocard Substrato I. I pozzetti di reazione sono quindi incubati per altri cinque minuti durante i quali il Coniugato Enzimatico modifica il Immunocard Substrato I. Le reazioni sono lette visivamente. La comparsa del colore blu nel pozzetto di reazione TEST indica un risultato positivo. Nel pozzetto di reazione CONTROL, gli anticorpi anti-tossine del coniugato si legano direttamente alle tossine immobilizzate nel pozzetto di reazione. La comparsa del colore blu nel pozzetto di reazione CONTROL indica che è stato aggiunto il campione, che i reagenti erano attivi al momento del loro utilizzo e che si è verificata una corretta migrazione del campione.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI
Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.
1. **Immunocard Toxins A & B, dispositivo test (test card):** Un supporto in plastica, contenente due membrane, sigillato in una confezione d'alluminio con un essiccante. Sulle membrane sono immobilizzati anticorpi monoclonali anti-tossina A e anticorpi policlonali di capra anti-tossina B nel pozzetto di reazione TEST e tossine del *C. difficile* nel pozzetto di reazione CONTROL. Conservare le card a 2-8 C.
2. **Diluente del Campione*:** Soluzione proteica tamponata contenente gentamicina e thimerosal (0,02%) come conservanti. Conservare a 2-8 C.
3. **Controllo Positivo*:** Estratto di Tossine di *C. difficile*, inattivate, in una soluzione tamponata di thimerosal (0,02%) come conservante. Il reagente è fornito pronto per l'uso. Conservare a 2-8 C.
4. **Coniugato Enzimatico*:** Miscela di anticorpi policlonali di capra anti-tossine A e B marcati con perossidasi di rafano e sospesi in una soluzione proteica tamponata contenente gentamicina e thimerosal (0,02%). Conservare a 2-8 C.
5. **Immunocard Soluzione di Lavaggio I*:** Soluzione tamponata contenente thimerosal (0,01%) come conservante. Conservare a 2-8 C.
6. **Immunocard Substrato I*:** Una soluzione tamponata contenente tetrametilbenzidina e perossido. Conservare a 2-8 C.
7. Pipette di trasferimento usa e getta, con tacche di misurazione indicanti 25 µL e 150 µL.

* In flacone gocciolatore di plastica. Pronto all'uso.

MATERIALI NON FORNITI
1. Guanti di lattice monouso che devono essere usati durante la manipolazione di campioni fecali che sono da considerarsi materiale biologico potenzialmente pericoloso
2. Vortex per sospendere il campione fecale nel diluente del campione
3. Timer
4. Bastoncini di legno
5. Provette, 10 x 75 mm oppure 12 x 75 mm

PRECAUZIONI
1. **Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.**
2. **Non conservare a temperatura superiore a 2-8 C. Non congelare.**
3. **Seguire attentamente la metodica qui descritta; in caso contrario si potrebbero ottenere risultati falsamente negativi o falsamente positivi.**
4. **I campioni ottenuti da pazienti possono contenere agenti infettivi, quindi devono essere maneggiati ed eliminati seguendo le opportune procedure per materiale biologicamente pericoloso.**
5. **NON scambiare tra kit di lotti differenti le Test Card, il Coniugato Enzimatico ed il Controllo Positivo. Gli altri reagenti (Diluente del Campione, Immunocard Soluzione di Lavaggio I e Immunocard Substrato I) possono essere scambiati tra kit di lotti differenti, purché utilizzati entro la scadenza. Non usare dopo la data di scadenza riportata sull'etichetta.**
6. **Qualunque sia la consistenza delle feci, i campioni devono essere mescolati accuratamente in per garantire l'analisi di materiale rappresentativo.**
7. **Prima di eseguire il test e per evitare di ridurre la sua sensibilità, attendere che i campioni e i reagenti raggiungano temperatura ambiente (20-26 C).**
8. **Ispezionare le confezioni delle test card prima di aprirle. Non usare card che si trovano in confezioni bucate o mal sigillate. Non usare la card se l'indicatore dell'essiccante ha cambiato colore, da blu a rosa. Si potrebbero ottenere risultati falsamente negativi per il deterioramento delle card mal conservate.**
9. **Non usare il Diluente del Campione o il Controllo Positivo se sono scoloriti o torbidi. Perdita di colore o torbidità potrebbero essere segno di contaminazione microbiologica. È invece normale che la Immunocard Soluzione di Lavaggio 1 appaia leggermente torbida.**
10. **Il Immunocard Substrato I è sensibile alla luce e dovrebbe essere conservato al buio. Tale reagente deve apparire incolore e limpido; Se invece appare torbido o colorato non deve essere utilizzato.**
11. **Durante la dispensazione, mantenere i flaconi dei reagenti in posizione perfettamente verticale, in modo da assicurare una regolare erogazione ed una costante dimensione delle gocce.**

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

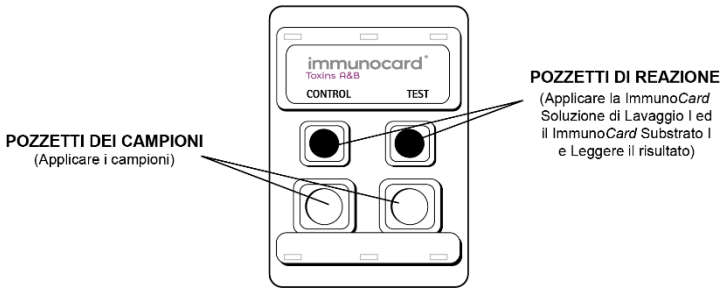
 ImmunoCard Wash Buffer I	**Segnalazione** Pericolo Contiene Imidazole **Indicazioni di pericolo** H315 - Provoca irritazione cutanea H319 - Provoca grave irritazione oculare H360D - Può nuocere al feto **Consigli di Prudenza - UE (§28, 1272/2008)** P321 - Trattamento specifico (vedere Section 4 su questa etichetta). P264 - Lavare accuratamente viso, mani ed eventuale superficie cutanea esposta dopo l'uso. P280 - Indossare protezione per occhi/viso. P337 + P313 - Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. P201 - Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. P202 - Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze. P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P308 + P313 - IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni fecali devono essere trasportati in un contenitore ermetico e conservati a 2-8 C fino all'uso. Il campione deve essere analizzato il più presto possibile, ma può essere conservato per quattro giorni a 2-8 C. Se il test non può essere effettuato entro questo intervallo di tempo, il campione deve essere congelato non appena ricevuto (≤ -20 C) fino al momento del test. I campioni possono essere congelati e scongelati fino ad un massimo di tre volte.

NOTE PROCEDURALI

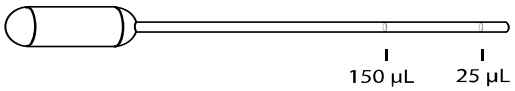
1. Lo Schema della Immunocard è riportato qui di seguito:



2. È possibile processare più di un campione per volta se, **per ogni card**, sono mantenuti gli appropriati passaggi, la corretta sequenza di reagenti, i giusti intervalli di tempo per le incubazioni e la lettura dei risultati. Ciascun passaggio procedurale dovrebbe essere completato con ciascun campione prima di procedere al passaggio successivo.
3. Il lato **Control** (sinistro) di ciascuna card fornisce un controllo interno per ogni campione. Questo verifica la corretta diluizione di ciascun campione e la funzionalità dei reagenti.

PROCEDURA DEL TEST

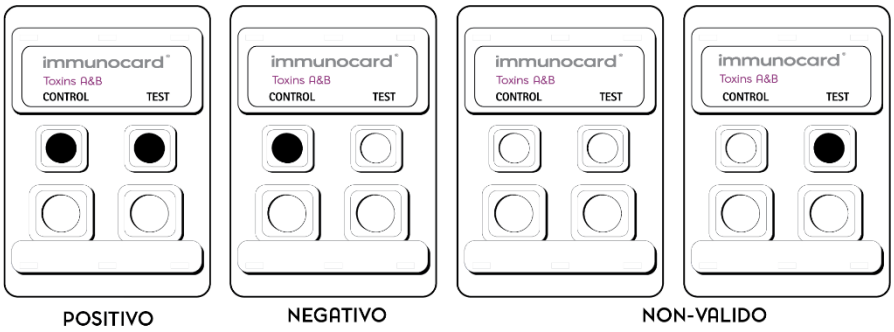
1. Portare tutte le card, reagenti e campioni a temperatura ambiente (20-26 C) prima di eseguire il test, rimuovendo i reagenti dalla scatola del kit per facilitare il raggiungimento della temperatura ambiente. **I reagenti potrebbero richiedere 60 minuti** per raggiungere temperatura ambiente. **RIPORTARE A 2-8 C IMMEDIATAMENTE DOPO L'UTILIZZO.**
2. Etichettare 1 provetta per ciascun campione da analizzare.
3. Aggiungere 200 µL di Diluente del Campione a ciascuna provetta usando il gocciolatore nel flacone.
4. Aggiungere 3 gocce di Coniugato Enzimatico (150 µL) a ciascuna provetta. Agitare le provette su vortex.
5. Aggiungere immediatamente il campione fecale o i controlli nel modo seguente:
   a. **Feci liquide/semi solide –** Mescolare bene il campione fecale. Usando una pipetta di trasferimento (inclusa nel kit) aspirare le feci fino alla prima tacca dall'estremità (25 µL). Trasferire le feci nella soluzione preparata di diluente/coniugato. Usare la stessa pipetta per mescolare le feci aspirando gentilmente e poi rilasciando la sospensione per parecchie volte. Agitare su vortex la soluzione finale per 10 secondi. Lasciare la pipetta nella provetta per riutilizzarla successivamente nel corso del test.*



   b. **Feci formate/solide –** Mescolare bene il campione fecale. Usando un bastoncino di legno, trasferire una piccola porzione (di circa 2 mm di diametro) di feci nella soluzione preparata di diluente/coniugato. Sospendere il campione usando il bastoncino e quindi mescolare bene su vortex per 10 secondi. Aggiungere una pipetta nella provetta: essa verrà usata successivamente nel corso del test.*
   c. **Controllo facoltativo –** Usando il flacone gocciolatore, aggiungere 1 goccia di Controllo Positivo o Controllo Negativo (il Diluente del Campione incluso nel kit) alla soluzione preparata di diluente/coniugato. Agitare su vortex per 10 secondi. Aggiungere una pipetta nella provetta: essa verrà usata successivamente nel corso del test.

   ***NOTA: Trasferire un quantitativo di campione troppo piccolo o non mescolare opportunamente e non sospendere bene il campione nella soluzione di diluente/coniugato potrebbe portare a risultati falsamente negativi. Aggiungere quantità eccessive di campione potrebbe invece invalidare i risultati limitando il flusso del campione.**
6. Lasciare riposare ciascun campione diluito da un minimo di cinque minuti ad un massimo di 24 ore, a 20-26 C. In caso di incubazione superiore ai 6 minuti, occorre sigillare la provetta.
7. Usare 1 Immunocard per ciascun campione e per ciascun controllo. Quando si è pronti ad eseguire il test, rimuovere la Immunocard dalla sua confezione. Eliminare la confezione e l'essiccante. Identificare la card annotandovi il nome del paziente o del controllo in modo indelelebile.
8. Agitare su vortex ciascun campione o controllo per 10 secondi prima dell'uso.
9. Aggiungere 150 µL di ciascun campione o controllo a ciascuno dei due pozzetti per il campione sulla card test (150 µL sono individuati dalla seconda tacca sulla pipetta di trasferimento).
10. Incubare per 5 ± 1 minuti a 20-26 C. NOTA: Al termine dell'incubazione entrambi i pozzetti di reazione devono apparire completamente umidi. Se l'uno o l'altro dei pozzetti di reazione non è completamente umido, scartare la card test e ripetere la procedura. Procedere con il test anche se il campione non viene completamente assorbito nel pozzetto del campione, purché entrambi i pozzetti di reazione siano completamente umidi.
11. Dispensare 3 gocce della Immunocard Soluzione di Lavaggio 1 in ciascun pozzetto di reazione, mantenendo il flacone dispensatore in posizione perfettamente verticale.
12. Una volta che la Immunocard Soluzione di Lavaggio I è stata completamente assorbita, aggiungere 3 gocce di Immunocard Substrato I, mantenendo il flacone dispensatore in posizione perfettamente verticale.
13. Incubare le card test a 20-26 C per c minuti esatti.
14. **Leggere visivamente i risultati di ciascuna card entro 30 secondi dal termine dell'incubazione.**

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI



PER INTERPRETARE I RISULTATI LEGGERE SOLO I POZZETTI SUPERIORI

NOTA: Ignorare lo sviluppo di colore nei pozzetti dei campioni (i pozzetti inferiori).

Risultato positivo del test colore blu nei pozzetti di reazione TEST (in alto a destra) e CONTROL (in alto a sinistra). L'intensità del colore blu nel pozzetto TEST può variare e il colore può non essere omogeneo. Un risultato positivo del test indica la presenza della tossina A e/o B nel campione. NB: in caso di risultato positivo il colore blu nel pozzetto TEST può anche apparire meno intenso di quello nel pozzetto CONTROL.

Risultato negativo del test colore blu solo nel pozzetto di reazione CONTROL (in alto a sinistra). Il pozzetto di reazione TEST (in alto a destra) deve essere incolore (quando la membrana si bagna, il pozzetto TEST può apparire lievemente grigio). Un risultato negativo del test indica che le tossine del *C. difficile* sono assenti o al di sotto del limite di rivelazione del test.

Risultati non validi del test

1. Non è visibile alcun colore nel pozzetto di reazione CONTROL. Il mancato funzionamento del controllo interno (CONTROL) invalida ogni risultato. L'insuccesso del test può essere dovuto ad un cattivo funzionamento di un reagente o di una card, alla mancata aggiunta o migrazione del campione o alla inadeguata diluizione del campione che ha provocato una occlusione dei pozzetti inferiori della card. Campioni con livelli estremamente alti di tossine potrebbero anche dare un pozzetto TEST positivo pur presentando un pozzetto CONTROL negativo. In questo caso è comunque necessario ripetere il test.
2. Presenza di un anello blu all'esterno dei bordi in plastica che delimitano il pozzetto TEST (in alto a destra) durante la procedura del test.
   Quando si ottengono risultati non validi, occorre ripetere il test su una nuova card, effettuando *ex-novo* anche la diluizione del campione.

CONTROLLO QUALITÀ

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

Ogni card contiene un controllo interno. La comparsa di un colore blu nel pozzetto di reazione CONTROL indica la funzionalità del test durante l'uso, l'aggiunta del campione e la sua corretta migrazione sulla membrana.

Le prestazioni di ogni nuovo lotto o di ogni nuova spedizione del Kit Immunocard GDH dovrebbero essere verificate alla ricezione o prima dell'uso. Il controllo positivo è fornito nel kit. Il controllo è da utilizzarsi esclusivamente per verificare la reattività dei reagenti necessari per il test e non per determinare la precisione analitica del kit al limite di rilevazione. Come Controllo Negativo si deve utilizzare il Diluente del Campione. Ulteriori test possono essere effettuati con i controlli per rispondere alle esigenze delle norme locali, statali e/o federali e/o delle organizzazioni accreditanti. I risultati attesi con i controlli sono descritti nella sezione INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI. Le card non devono essere usate se i test di controllo non producono i risultati attesi. Risultati corretti nella Porta CONTROL, e risultati con il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (il Diluente del Campione) servono come indicatori che il test sia stato eseguito correttamente, che gli anticorpi immobilizzati sulla membrana e il Coniugato siano attivi al momento dell'uso, e che la membrana supporti un flusso corretto. Se non si ottengono i risultati attesi con i controlli interni ed esterni significa o che uno o più di reagenti del KIT sono difettosi o che il test non è stato effettuato correttamente (ad esempio aggiunta di un volume sbagliato di reagenti, temperatura di incubazione e tempi scorretti, reagenti non a temperatura ambiente prima dell'esecuzione del test). **Se non si ottengono i risultati attesi con i Controlli, come prima opzione 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, (in Italia +390331433636).**

VALORI ATTESI

La frequenza d'insorgenza di diarrea da antibiotici causata da *C. difficile* dipende da differenti fattori tra cui il tipo di popolazione, le strutture e l'epidemiologia. L'incidenza riportata di patologie associate a *C. difficile* in pazienti con patologie legate alla terapia antibiotica è del 15-20%; ciononostante in strutture differenti si possono rilevare percentuali al di sotto o al di sopra di tale intervallo.[2, 3, 5] Non sono attesi risultati positivi in pazienti non infetti.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Il test è di tipo QUALITATIVO e quando si riportano i risultati nessuna interpretazione di tipo quantitativo deve essere effettuata in considerazione sulla base dell'intensità del colore sviluppato.
2. Un risultato Positivo del test conferma unicamente la presenza della tossina A e/o della tossina B. Per diagnosticare una patologia dovuta a *C. difficile* il medico deve associare il risultato del test ad altre procedure diagnostiche e all'osservazione delle condizioni del paziente. I livelli delle tossine non sempre sono correlati direttamente con la presenza o la severità della patologia.[1]
3. Isolati di *C. sordellii* possono reagire con questo test a causa dell'identità immunologica delle tossine di *C. sordelli.*[3]
4. Le prestazioni su campioni pediatrici non sono state valuate.
5. Due diversi gruppi di individui sono stati identificati come portatori asintomatici di *C. difficile* ad elevate percentuali. Nei bambini sono state riportate percentuali di colonizzazione fino al 50% ed oltre,[3] mentre percentuali di colonizzazione fino al 32% sono state riportate nei pazienti affetti da fibrosi cistica.[4]
6. 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

Studi Comparativi

Tre laboratori indipendenti hanno analizzato i campioni utilizzando in parallelo l'Immunocard Toxins A & B e il saggio standard di citotossicità con procedura di neutralizzazione. I risultati degli studi effettuati sono qui di seguito riportati.

Analisi Prospettica	**ICTAB**			
	Pos	**Neg**	**Totale**	
Citotossicità Positivo (Std)	67	5	72	
Citotossicità Negativo (Std)	2	176	178	
Totale	69	181	250	
				95% CI
Sensibilità Clinica		67/72 (93,1%)		87,1-98,9%
Specificità Clinica		176/178 (98,9%)		97,6-100%
Valore Predittivo Positivo		67/69 (97,1%)		92,9-100%
Valore Predittivo Negativo		176/181 (97,2%)		94,5-99,5%
Analisi Retrospettiva	**ICTAB**			
	Pos	**Neg**	**Totale**	
Citotossicità Positivo (Std)	33	0	33	
Citotossicità Negativo (Std)	5	303	308	
Totale	38	303	341	
				95% CI
Sensibilità Clinica		33/33 (100%)		N/A
Specificità Clinica		303/308 (98,4%)		96,4-99,6%
Valore Predittivo Positivo		33/38 (86,8%)		76,2-97,8%
Valore Predittivo Negativo		303/303 (100%)		N/A

SENSIBILITA ANALITICA

Il limite inferiore di rilevazione (LOD) di questo test è approssimativamente di 3 ng di Tossina A e 3 ng di Tossina B per mL di feci. Questo limite di rilevazione non varia a seconda che il campione di partenza sia costituito da feci solide, liquide o semi-liquide.

RIPRODUCIBILITÀ

La riproducibilità dell'Immunocard Toxins A & B è stata determinata utilizzando campioni negativi noti (n=2) e campioni positivi noti (n=6), a cui è stato assegnato un codice. Il test è stato condotto in modo che l'operatore non conoscesse la natura del campione durante lo svolgimento del test. Due dei campioni positivi utilizzati si avvicinavano al limite di rilevazione del test. Tre laboratori differenti hanno analizato i campioni in tre giorni consecutivi. I test hanno dato i risultati attesi nel 100% delle prove effettuate.

SPECIFICITA ANALITICA

Campioni fecali inoculati con i seguenti agenti microbici (ad una concentrazione finale ≥ 1 x 10^8 organismi/mL) non reagiscono con l'Immunocard Toxins A & B: Adenovirus 40, Adenovirus 41, *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, nontoxigenic C. difficile* (10 ceppi), *Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* ceppi 9714, *Clostridium sporogenes, Enterobacter cloacae, Escherichia* coli (quattro ceppi, tra cui due ceppi O157:H7), *Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Porphyromonas asaccharolytica, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa,* Rotavirus, *Salmonella typhimurium, Serratia liquefaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* Cowan I, *Staphylococcus epidermidis, Streptococcus faecalis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica.* L'unico microrganismo, oltre a *C. difficile,* che ha reagito con l'Immunocard Toxins A & B è stato il *C. sordellii* VPI 9048. Questo ceppo, infatti, produce tossine HT e LT, omologhe delle tossine A e B.

ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

Le seguenti sostanze non hanno alcun effetto sul test quando sono presenti nelle feci alle concentrazioni indicate: grasso fecale (4,8% w/v), sangue intero (40% v/v), mucina (3,5% w/v), Metronidazolo (0,25% w/v), Vancomicina (0,25% w/v), solfato di bario (5% w/v), Imodium AD® (5% w/v), Kaopectate® (5 mg/mL), Pepto Bismolo® (5% v/v).

Informazioni aggiuntive sulle prestazioni e le caratteristiche del test possono essere richieste alla Servizio Assistenza Meridian e negli USA (telefono +1-800-343-3858) oppure al Distributore Locale (per l'Italia 0331433636).

FRANÇAIS

immunocard®
Toxins A&B

Test immunoenzymatique rapide de détection des toxines A et B de *Clostridium difficile* dans les échantillons de selles

REF **712050** IVD **Rx Only**

BUT DE LA METHODE
Le test Immunocard Toxins A & B est une méthode immunoenzymatique (EIA) rapide et qualitative, à flux horizontal, destinée à la détection des toxines A et B de *Clostridium difficile* dans les échantillons de selles humaines. Ce test est destiné à faciliter le diagnostic des infections associées à *C. difficile*.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST
La bactérie toxinogène *Clostridium difficile* est la première cause de diarrhée infectieuse nosocomiale dans les pays développés. Aux Etats-Unis, les cas hospitaliers de maladies associées à *C. difficile* sont estimés à 300 000 par an.[1, 2] *Clostridium difficile* représente l'agent étiologique dans environ 25 % de tous les cas de diarrhée associée aux antibiotiques. Pratiquement tous les antibiotiques peuvent conduire à une maladie associée à *C. difficile*. Les symptômes cliniques d'une maladie associée à *C. difficile* vont d'une colonisation asymptomatique à une colite pseudomembraneuse ou une colectasie mettant en danger la vie du patient.[2] La plupart des souches pathogènes de *C. difficile* produisent deux toxines qui sont biologiquement et immunologiquement distinctes: la toxine A (entérotoxine) et la toxine B (cytotoxine). La toxine A était auparavant considérée comme responsable de la plupart des pathologies observées dans les maladies associées à *C. difficile* chez l'homme, jusqu'à ce que l'on rapporte vers la fin des années 90 des maladies cliniquement prouvées provoquées par des souches de *C. difficile* ne produisant que la toxine B.[1] En général, le test de détection de *C. difficile* le plus fiable est une mise en évidence par cytotoxicité. Cependant, la méthode requiert des installations permettant la culture tissulaire, une incubation de 48 à 72 heures, et n'est pas normalisée.[2] L'utilisation d'un test rapide comme Immunocard Toxins A & B permet au médecin de diagnostiquer rapidement l'infection, afin de commencer un traitement adéquat et d'initier des précautions d'isolement entérique en un milieu hospitalier.[2]

PRINCIPE DU TEST
La carte de test Immunocard Toxins A & B est constituée d'une membrane maintenue dans un cadre en plastique qui présente deux fenêtres «Echantillon» et deux fenêtres «Réaction». Des anticorps dirigés contre les toxines A et B sont fixés sur la membrane. Le réactif Conjugué Enzymatique est composé d'anticorps anti-toxines A et B couplés à la peroxydase de raifort. Pour effectuer le test, un échantillon de selles du patient est dilué avec le Diluant pour Echantillon et mélangé avec le Conjugué Enzymatique. Le mélange est incubé pendant cinq minutes à 24 heures à température ambiante (20 à 26 C). Au cours de l'incubation, les molécules de toxines éventuellement présentes se lient aux anticorps anti-toxines (conjugué). Après l'incubation, une aliquote du mélange est déposée dans les deux fenêtres Echantillon de la carte, et la carte est incubée pendant cinq minutes à température ambiante (20 à 26 C). Pendant cette seconde phase d'incubation, le complexe toxines-conjugué se sépare des matières en suspension et migre à travers la membrane avec la partie liquide de l'échantillon, en direction des fenêtres Réaction TEST et CONTROL. Les complexes toxines-conjugué sont alors capturés au niveau de la fenêtre Réaction TEST par les anticorps dirigés contre les toxines, immobilisés sur la membrane au niveau de la fenêtre Réaction. La seconde fenêtre Réaction sert de contrôle interne. Les deux fenêtres Réaction sont lavées avec l'Immunocard solution de lavage I pour éliminer les protéines contaminatrices non fixées, puis l' Immunocard Substrat I est ajouté. La carte est de nouveau incubée pendant cinq minutes, pendant lesquelles l'enzyme fixée sur le conjugué modifie l'Immunocard Substrat I. Il en résulte une couleur bleue. Les réactions sont lues visuellement. L'apparition de la couleur bleue dans la fenêtre Réaction TEST indique un test positif. Dans la fenêtre CONTROL, les anticorps anti-toxines du conjugué se lient directement à la toxine immobilisée. L'apparition d'une couleur bleue dans la fenêtre Réaction CONTROL indique que l'échantillon a été ajouté, que les réactifs étaient actifs au moment de leur utilisation, et que la migration de l'échantillon s'est faite correctement.

MATERIEL FOURNI
Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boite.
1. **Carte de test Immunocard Toxins A & B:** membrane maintenue dans un cadre en plastique, emballée dans une pochette aluminium contenant un dessicatif. La membrane est recouverte d'anticorps monoclonaux immobilisés anti-toxine A et d'anticorps polyclonaux de chèvre anti-toxine B, au niveau de la fenêtre Réaction TEST; de toxine de *C. difficile*, au niveau de la fenêtre Réaction CONTROL. A conserver entre 2 et 8 C lorsque le test n'est pas utilisé.
2. **Diluant pour Echantillon*:** solution protéique tamponnée contenant de la gentamicine et du thimérosal (0,02 %) comme conservateurs. A conserver entre 2 et 8 C lorsque le test n'est pas utilisé.
3. **Contrôle Positif*:** toxine de *C. difficile* inactivée dans une solution tamponnée contenant du thimérosal (0,02 %) comme conservateur. Le réactif est fourni prêt à l'emploi. A conserver entre 2 et 8 C lorsque le test n'est pas utilisé.
4. **Conjugué Enzymatique*:** mélange d'anticorps polyclonaux de chèvre anti-toxines A et B conjugués à la peroxydase de raifort et mis en suspension dans une solution protéique tamponnée contenant de la gentamicine et du thimérosal (0,02 %) comme conservateurs. A conserver entre 2 et 8 C lorsque le test n'est pas utilisé.
5. **Immunocard Solution de lavage I*:** solution tamponnée contenant du thimérosal (0,01 %) comme conservateur. A conserver entre 2 et 8 C lorsque le test n'est pas utilisé.
6. **Immunocard Substrat I*:** solution tamponnée contenant de la tétraméthylbenzidine et du peroxyde. A conserver entre 2 et 8 C lorsque le test n'est pas utilisé.
7. Pipettes de transfert en plastique avec repères de mesure de 25 µL et 150 µL.

* En flacon compte-gouttes en plastique. Prêt à l'emploi.

MATERIEL NON FOURNI
1. Gants jetables en latex qui doivent être portés durant la manipulation des échantillons fécaux, considérés comme potentiellement biologiquement dangereux
2. Vortex pour la mise en suspension des selles dans le Diluant pour Echantillon
3. Minuteur
4. Spatules en bois
5. Petits tubes de test, de type 10 x 75 mm ou 12 x 75 mm

PRECAUTIONS D'EMPLOI
1. **Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.**
2. **Ne pas conserver à une température supérieure à 2-8 C. Ne pas congeler.**
3. **Bien suivre la méthode établie indiquée dans la notice sous peine d'obtenir des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.**
4. **Certains échantillons de patients contiennent des agents infectieux. Tous les échantillons doivent donc être manipulés et éliminés comme s'ils étaient biologiquement dangereux.**
5. **NE PAS inter-changer les cartes de test, les conjugués enzymatiques et les contrôles positifs provenant de différents numéros de lot de coffret. Les autres réactifs (diluant pour échantillon, Immunocard Solution de lavage I, Immunocard Substrat I) peuvent être inter-changés entre les coffrets, à condition qu'ils ne soient pas périmés. Ne pas utiliser des réactifs après la date de péremption figurant sur les étiquettes.**
6. **Bien mélanger tous les échantillons avant de réaliser le test, quelle que soit la consistance des selles, afin d'assurer un échantillon représentatif.**
7. **Ramener les échantillons et les réactifs à température ambiante (20-26 C) avant l'analyse, pour assurer une sensibilité maximale du test.**
8. **Inspecter les pochettes avant de retirer les cartes de test. Ne pas utiliser les cartes de test dont la pochette est percée ou mal scellée. Ne pas utiliser les cartes de test si l'indicateur du dessiccatif a viré du bleu au rose. Des réactions faussement négatives peuvent survenir si les cartes de test sont endommagées à la suite d'un stockage incorrect.**
9. **Ne pas utiliser le Diluant pour Echantillon ou le Contrôle Positif s'ils sont décolorés ou présentent une turbidité. Une décoloration ou un trouble peut indiquer une contamination microbienne. Il est normal que l' Immunocard Solution de lavage I ait une apparence légèrement trouble.**
10. **Le Immunocard Substrat I est photosensible et doit être conservé dans le noir. Le réactif doit présenter une apparence claire et incolore. Le réactif doit être éliminé s'il présente une couleur (n'importe laquelle) ou un trouble.**
11. **Maintenir les flacons de réactif à la verticale lors des dépôts pour assurer une taille des gouttes correcte et une distribution régulière.**

DANGER ET MISES EN GARDE

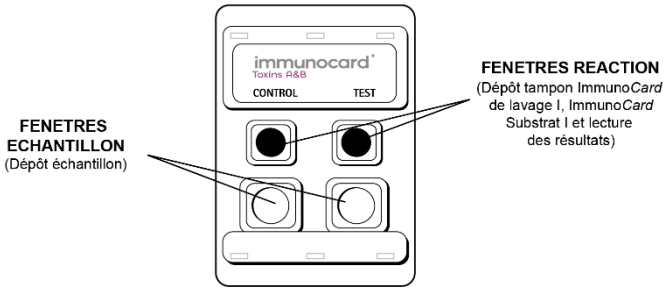
 ImmunoCard Wash Buffer I	**Mention d'avertissement** Danger Contient Imidazole **Mentions de danger** H315 - Provoque une irritation cutanée H319 - Provoque une sévère irritation des yeux H360D - Peut nuire au foetus **Conseils de prudence - UE (par 28, 1272/2008)** P321 - Traitement spécifique (voir Section 4 sur cette étiquette). P264 - Se laver le visage, les mains et toute surface de peau exposée soigneusement après manipulation. P280 - Porter un équipement de protection des yeux/du visage. P337 + P313 - Si l'irritation oculaire persiste : Consulter un médecin. P201 - Se procurer les instructions spéciales avant utilisation. P202 - Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. P280 - Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. P308 + P313 - EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : Consulter un médecin.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons de selle doivent être transportés dans un récipient étanche à l'air et conservés entre 2 et 8 C jusqu'au moment du test. Les échantillons doivent être testés le plus tôt possible, mais peuvent être conservés jusqu'à quatre jours entre 2 et 8 C avant le test. Si le test ne peut être effectué dans ce laps de temps, les échantillons doivent être congelés dès réception et conservés congelés (≤ -20 C) jusqu'au moment du test. Si nécessaire, les échantillons peuvent être congelés et décongelés jusqu'à trois fois.

REMARQUES SUR LA PROCEDURE

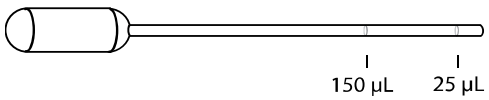
1. La carte de test Immunocard est schématisée ci-dessous:



2. Il est possible de tester les échantillons ou les contrôles par séries à condition que, **pour chaque carte**, les étapes, la séquence de dépôt des réactifs, l'incubation et les délais de lecture des résultats soient maintenus. Chaque étape de la procédure doit être achevée pour chaque échantillon avant de commencer l'étape suivante.
3. Le côté **Control** (gauche) de chaque carte fournit un contrôle interne pour chaque échantillon. Ceci permet de vérifier si l'échantillon est suffisamment dilué et si les réactifs fonctionnent correctement.

PROCEDURE DE TEST

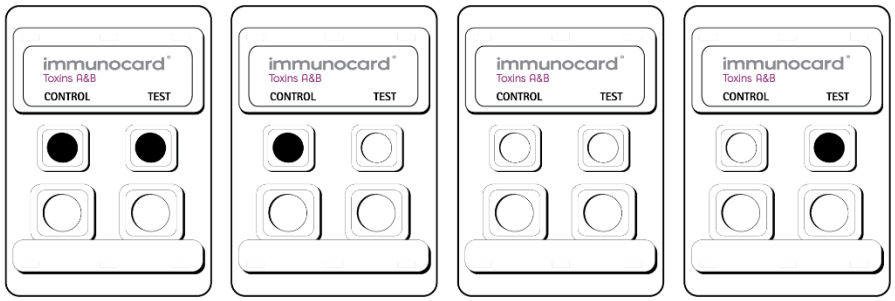
1. Ramener les cartes de test, les réactifs et les échantillons à température ambiante (20-26 C) avant le test. Retirer les réactifs de la trousse pour qu'ils se réchauffent. **Il peut être nécessaire d'attendre jusqu'à 60 minutes pour que les réactifs se réchauffent au sortir du réfrigérateur. REMETTRE LES REACTIFS A 2-8 C IMMEDIATEMENT APRES UTILISATION.**
2. Etiqueter 1 tube de test pour chaque échantillon de patient à analyser.
3. Introduire 200 µL de Diluant pour Echantillon dans chaque tube de test à l'aide du compte-gouttes du flacon.
4. Ajouter 3 gouttes de Conjugué Enzymatique (150 µL) dans chaque tube.
5. Ajouter immédiatement les selles ou le contrôle comme suit :
   a. **Selles liquides/semi-solides:** Bien mélanger l'échantillon de selle. A l'aide d'une pipette de transfert propre (fournie dans le coffret), aspirer la selle jusqu'au premier repère à partir de l'extrémité (25 µL). Transférer la selle dans le mélange diluant/conjugué. Utiliser la même pipette pour mélanger la selle en aspirant et en vidant doucement la pipette plusieurs fois. Passer le mélange final au vortex pendant 10 secondes. Laisser la pipette dans le tube pour l'utiliser plus tard au cours du test.*



   b. **Selles moulées/solides:** Bien mélanger l'échantillon de selle. A l'aide d'une spatule en bois, transférer un petit échantillon (environ 2 mm de diamètre) de selle dans le mélange diluant/conjugué. Emulsionner l'échantillon à l'aide de la spatule en bois, puis mélanger soigneusement au vortex pendant 10 secondes. Déposer une pipette dans le tube et laisser de côté pour une utilisation ultérieure.*
   c. **Contrôle optionnel:** A l'aide des flacons compte-gouttes, déposer une goutte de Contrôle Positif ou de Contrôle Négatif (Diluant pour Echantillon) (fournis dans le coffret) au mélange diluant/conjugué. Mélanger au vortex pendant 10 secondes. Ajouter une pipette au tube et laisser de côté pour l'utiliser ultérieurement au cours du test.

   ***REMARQUE: Transférer trop peu d'échantillon, ou ne pas mélanger soigneusement, ou ne pas mettre l'échantillon en suspension dans le mélange diluant/conjugué peut entraîner un résultat faussement négatif. Ajouter trop d'échantillon peut entraîner un résultat non valide dû à une restriction du flux de l'échantillon.**
6. Laisser chaque échantillon dilué incuber pendant 5 minutes à 24 heures à température ambiante (20 à 26 C). Sceller l'échantillon de selle diluée ou le contrôle si conservé plus de 6 minutes.
7. Utiliser une carte de test Immunocard Toxins A & B pour chaque échantillon ou contrôle. Lorsque vous êtes prêts à passer au test, retirer la Carte de Test Immunocard Toxins A & B de sa pochette. Jeter la pochette et le dessicatif. Etiqueter la carte avec le nom du patient ou du contrôle.
8. Avant l'utilisation, mélanger chaque échantillon ou contrôle au vortex pendant 10 secondes.
9. Déposer 150 µL de chaque échantillon ou contrôle dans chacune des 2 fenêtres Echantillon de 1 carte de test (150 µL représente le second repère sur la pipette de transfert).
10. Incuber les cartes pendant 5 ± 1 minutes à température ambiante (20 à 26 C). REMARQUE : à la fin de l'incubation, les deux fenêtres Réaction doivent apparaître complètement humides. Si l'une des deux fenêtres ne semble pas complètement humide, jeter la carte de test et recommencer la procédure. Continuer le test si l'échantillon reste dans les fenêtres Echantillon et si les deux fenêtres Réaction sont complètement humides.
11. En maintenant le flacon Immunocard Solution de lavage I à la verticale, déposer exactement 3 gouttes dans chaque fenêtre Réaction.
12. Lorsque l'Immunocard Solution de lavage I a été complètement absorbé, ajouter exactement 3 gouttes de Immunocard Substrat I en tenant le flacon à la verticale.
13. Incuber la carte de test à température ambiante (20 à 26 C) pendant exactement 5 minutes.
14. **Lire visuellement les résultats de chaque carte dans les 30 secondes qui suivent la fin de l'incubation.**

INTERPRETATION DES RESULTATS



LIRE LES RESULTATS DANS LES FENETRES "REACTION" SUPERIEURES SEULEMENT

REMARQUE: Ignorer la coloration qui apparaît dans les fenêtres Echantillon. La couleur des fenêtres Echantillon n'est pas évaluée pendant le test.

Résultat positif: couleur bleue dans les fenêtres Réaction TEST (en haut à droite) et Réaction CONTROL (en haut à gauche). L'intensité de la couleur bleue de la fenêtre TEST peut varier du bas vers le haut de la fenêtre. Un test positif indique que la toxine A et/ou la toxine B de *C. difficile* est/sont présente(s) dans l'échantillon. REMARQUE: la fenêtre TEST peut apparaître moins bleue que la fenêtre CONTROL.

Résultat négatif: couleur bleue dans la fenêtre Réaction CONTROL (en haut à gauche) seulement. La fenêtre Réaction TEST (en haut à droite) est incolore. (L'humidité de la membrane peut faire apparaître la fenêtre TEST légèrement grise). Un résultat négatif indique que les toxines de *C. difficile* sont absentes, ou présentes à un niveau inférieur aux limites de détection du test. De manière occasionnelle, la fenêtre Réaction TEST (en haut à droite) peut montrer un soupçon de couleur bleue du côté gauche ou du côté droit de la fenêtre, le reste de la fenêtre étant incolore. Ceci doit être considéré comme un résultat de test négatif.

Résultats non valides:
1. Aucune couleur bleue n'est détectable dans la fenêtre Réaction CONTROL. L'absence de couleur dans la fenêtre CONTROL annule tout résultat du test. Un test non valide peut être dû au mauvais fonctionnement d'un réactif ou de la carte de test, ou à l'oubli du dépôt d'échantillon, ou à la non-migration de l'échantillon, ou à une erreur de dilution de l'échantillon entraînant un dépôt excessif sur la carte de test. Les échantillons ayant des niveaux extrêmement élevés en toxines peuvent aussi donner une fenêtre TEST positive avec une fenêtre CONTROL négative.
2. Un anneau bleu apparaît sur le cadre en plastique autour de la fenêtre TEST (en haut à droite) pendant le déroulement du test.

En cas d'obtention de résultats non valides, diluer de nouveau l'échantillon et refaire le test avec une nouvelle carte.

CONTROLE DE QUALITE

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

Chaque carte de test contient un contrôle de procédure interne. L'apparition d'une couleur bleue dans la fenêtre Réaction CONTROL permet de vérifier que le test fonctionnait au moment de l'utilisation, que l'échantillon a été ajouté, et que l'échantillon a migré correctement sur la carte.

La réactivité de chaque nouveau lot et de chaque nouvelle livraison de test Immunocard Toxins A & B doit être vérifiée à la réception ou avant l'utilisation. Le réactif de Contrôle Positif est fourni dans le coffret. Ce contrôle est utilisé pour vérifier la réactivité des autres composants associés au test, et n'est pas destiné à assurer la précision de la valeur-seuil analytique. Le Diluant pour Echantillon est utilisé comme Contrôle Négatif. Des tests supplémentaires peuvent être effectués avec les contrôles afin de se conformer aux exigences des réglementations locales et/ou nationales. Les résultats attendus avec les contrôles sont décrits sous la rubrique INTERPRETATION DES RESULTATS. Les cartes de test ne doivent pas être utilisées si les tests effectués sur les contrôles ne donnent pas les résultats attendus. Des résultats corrects obtenus avec la fenêtre Réaction CONTROL, le Contrôle Positif et le Contrôle Négatif (Diluant pour Echantillons) sont des indicateurs montrant que le test a été réalisé correctement, que les anticorps déposés sur la membrane et le Conjugué Enzymatique sont actifs au moment du test, et que la membrane permet un flux correct de l'échantillon. Si les contrôles internes et externes ne donnent pas les résultats attendus, il est possible que le test n'ait pas été réalisé correctement (par exemple: le volume des réactifs ajoutés est incorrect, la température ou les temps d'incubation sont incorrects, ou les réactifs n'ont pas été ramenés à température ambiante avant le test). **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.**

VALEURS ATTENDUES

La fréquence des diarrhées associées aux antibiotiques et provoquées par *C. difficile* dépend de différents facteurs, dont la population de patients, le type d'institution, et l'épidémiologie. L'incidence reportée des infections associées à *C. difficile* chez les patients chez qui on soupçonne une infection associée aux antibiotiques est de 15-20 %, bien que des établissements différents puissent obtenir des taux de positivité supérieurs ou inférieurs. [2, 3, 5] Il n'est pas attendu de résultat positif chez un patient non infecté.

LIMITES DU TEST
1. Ce test est un test uniquement qualitatif. Aucune interprétation quantitative ne doit être réalisée par rapport à l'intensité de la couleur lorsque les résultats sont reportés.
2. Un résultat de test positif confirme seulement la présence de toxine A et / ou de toxine B. Le médecin doit utiliser les résultats du test en conjonction avec les autres procédures de diagnostic et l'état clinique du patient, pour établir un diagnostic de maladie associée à *C. difficile*. Le niveau de toxines n'est pas toujours directement corrélé avec la présence ou la gravité de la maladie.[1]
3. Des isolats de *C. sordellii* peuvent réagir avec ce test, du fait de l'identité immunologique des toxines de *C. sordellii* avec celles de *C. difficile*.[3]
4. La performance d'échantillons provenant de populations pédiatriques n'a pas été évaluée.
5. Deux groupes distincts ont été identifiés, qui peuvent abriter *C. difficile* de manière asymptomatique à des taux très élevés. Des taux de colonisation jusqu'à 50 % et plus ont été rapportés chez les jeunes enfants [3] et des taux jusqu'à 32 % chez des patients atteints de fibrose cystique.[4]
6. 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

Etude comparative

Trois laboratoires indépendants ont testé des échantillons de selles avec le test Immunocard Toxins A & B et le test standard de cytotoxicité cellulaire suivi de neutralisation. Les résultats des tests réalisés en parallèle sont donnés ci-dessous:

Echantillons Prospectifs	**ICTAB**		
	Pos	**Nég**	**Total**
Cytotoxine Pos (std)	67	5	72
Cytotoxine Nég (std)	2	176	178
Total	69	181	250

		95% IC
Sensibilité clinique	67/72 (93,1%)	87,1-98,9%
Spécificité clinique	176/178 (98,9%)	97,6-100%
Valeur prédictive positive	67/69 (97,1%)	92,9-100%
Valeur prédictive négative	176/181 (97,2%)	94,5-99,5%

Echantillons Rétrospectifs	**ICTAB**		
	Pos	**Nég**	**Total**
Cytotoxine Pos (std)	33	0	33
Cytotoxine Nég (std)	5	303	308
Total	38	303	341

		95% IC
Sensibilité clinique	33/33 (100%)	N/A
Spécificité clinique	303/308 (98,4%)	96,4-99,6%
Valeur prédictive positive	33/38 (86,8%)	76,2-97,8%
Valeur prédictive négative	303/303 (100%)	N/A

SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

La limite inférieure de détection des toxines par ce test est d'environ 3 ng de toxine A et 3 ng de toxine B par mL de selles. Cette limite ne varie pas entre des échantillons de selles liquides ou semi-solides.

REPRODUCTIBILITÉ DU TEST

La reproductibilité du test Immunocard Toxins A & B a été étudiée sur des échantillons connus négatifs (n=2) et positifs (n=6) qui ont été codés et présentés de manière aléatoire afin d'empêcher leur identification pendant le déroulement des tests. Deux des échantillons positifs étaient proches de la limite de détection du test. Trois laboratoires ont testé ces échantillons, sur trois jours consécutifs. Les échantillons ont donné les résultats attendus à 100 % des essais.

SPECIFICITE ANALYTIQUE

Des échantillons de selles inoculés avec les agents microbiens suivants (concentration finale de l'échantillon ≥ 1 x 10^8 organismes/mL) n'ont pas réagi avec le test Immunocard Toxins A & B : Adénovirus 40, Adénovirus 41, *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, C. difficile* non toxigénique (10 souches), *Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* souche 9714, *Clostridium sporogenes, Enterobacter cloacae, Escherichia coli* (quatre souches dont deux souches O157:H7), *Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Porphyromonas asaccharolytica, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa*, Rotavirus, *Salmonella typhimurium, Serratia liquefaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* Cowan I, *Staphylococcus epidermidis, Streptococcus faecalis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica.* Le seul microorganisme non-*C. difficile* ayant montré une réactivité avec le test Immunocard Toxins A & B est *C. sordellii* VPI 9048. Cette souche produit des homologues des toxines A et B, nommés HT et LT.

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Les substances suivantes n'ont montré aucun effet sur les résultats du test Immunocard Toxins A & B, lorsqu'elles sont présentes dans les selles aux quantités indiquées: lipides fécaux (4,8 % poids/volume), sang total (40 % v/v), mucine (3,5 % p/v), Metronidazole (0,25 % p/v), Vancomycine (0,25 % p/v), sulfate de baryum (5 % p/v), Imodium AD® (5 % p/v), Kaopectate® Caplets (5 mg/mL), Pepto Bismol® (5 % v/v).

Des informations supplémentaires concernant les performances de ce test peuvent être obtenues en contactant le service de Support Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance.

ESPAÑOL

immunocard®
Toxins A&B

Inmunoensayo enzimático rápido para la detección de las Toxinas A y B de *Clostridium difficile* en muestras de materia fecal

REF **712050** IVD **Rx Only**

USO INDICADO
El test Immunocard Toxins A & B es un inmunoensayo enzimático (EIA) de flujo horizontal para detectar las toxinas A y B de *Clostridium difficile* en materia fecal humana. Este inmunoensayo es para ayudar en el diagnóstico de enfermedades asociadas a *C. difficile*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA
Las cepas productoras de toxina de *Clostridium difficile* son la principal causa de diarrea infecciosa nosocomial en los países desarrollados. Se estima que tan solo en los hospitales estadounidenses se ven 300.000 casos de diarrea asociada con *C. difficile* (DACD) cada año.[1, 2] *Clostridium difficile* es el agente etiológico en aproximadamente un 25% de los casos de diarrea asociada al uso de antibióticos. Prácticamente cualquier antibiótico puede predisponer a un paciente a DACD. Los síntomas clínicos de la DACD varían desde la colonización asintomática hasta la colitis pseudo membranosa que puede ser mortal y el megacolon tóxico.[2] La mayoría de las cepas patógenas de *C. difficile* producen dos tipos de toxinas que son biológica e inmunológicamente diferentes: toxina A o enterotoxina y toxina B o citotoxina. Anteriormente se pensó que la toxina A era responsable por la mayor parte de las patologías vistas en la DACD en humanos, hasta la década de los noventa cuando aparecieron informes de enfermedad de importancia clínica causada por cepas de *C. difficile* que solo producen toxina B.[1] En general, el test más exacto para la detección de *C. difficile* es la prueba de la citotoxina; sin embargo, este método requiere de instalaciones con capacidad para cultivo tisular, toma entre 48 y 72 horas y no está estandarizado.[2] El uso de un test rápido tal como Immunocard Toxins A & B le permite al médico verificar la infección rápidamente, comenzar el tratamiento adecuado e iniciar precauciones de aislamiento entérico en un entorno hospitalario.[2]

PRINCIPIOS BIOLOGICOS
La prueba Immunocard Toxins A & B consiste de una membrana sostenida por un marco de plástico con dos puertos para muestra y dos puertos para reacción. La membrana transporta anticuerpos inmovilizados contra las Toxinas A y B. El reactivo de Conjugado Enzimático consiste de anticuerpos contra las toxinas A y B acoplados con peroxidasa de rábano. Para realizar la prueba, la muestra de materia fecal del paciente se diluye con Diluente para Muestra y Conjugado Enzimático. Una alícuota de la mezcla se añade a cada uno de los puertos para muestra. La prueba se incuba durante cinco minutos y 24 horas entre 20 y 26 C. Durante la incubación ocurren tres cosas: primero, las moléculas de toxina -si están presentes-se unen a los anticuerpos anti-toxina del Conjugado. Segundo, el complejo toxina-conjugado se separa de la materia en forma de partículas a medida que la porción líquida de la muestra fluye a través de la membrana hacia los puertos de reacción de TEST y de CONTROL. Tercero, los complejos de toxina-conjugado son capturados en el puerto de reacción TEST por la antitoxina inmovilizada en la membrana de reacción. El segundo de los dos puertos de reacción sirve como control interno. Subsiguientemente, ambos puertos de reacción se lavan con Immunocard Tampón de Lavado I para disminuir la interferencia por proteínas contaminantes antes de añadir el Immunocard Substrato I. Los puertos de reacción se incuban por cinco minutos adicionales durante los cuales el conjugado de la enzima modifica el Immunocard Substrato I. El resultado es la aparición de un color azul. Las reacciones se leen visualmente. El desarrollo de un color azul en el puerto de TEST indica un resultado positivo. En el puerto de CONTROL los anticuerpos anti-toxina del conjugado se unen directamente a la toxina inmovilizada. La aparición de un color azul en el puerto de CONTROL indica que la muestra fue añadida, que los reactivos estaban activos en el momento en que fueron usados y que ocurrió una migración apropiada de la muestra.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS
El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.
1. **Tarjeta de Prueba Immunocard Toxins A & B:** Una almohadilla de membrana empotrada en un armazón de plástico y envuelta en una bolsa de aluminio con desecante. La almohadilla contiene anti-toxina A monoclonal y anti-toxina B policlonal de cabra inmovilizadas en el puerto de reacción TEST y toxina cruda de *C. difficile* en el puerto de CONTROL. Almacene las tarjetas entre 2 y 8 C cuando no las esté usando.
2. **Diluyente de Muestra*:** Una solución proteica tamponada que contiene gentamicina y timerosal al 0,02% como agente preservante. Almacene entre 2 y 8 C cuando no se esté usando.
3. **Control Positivo*:** Toxina cruda e inactivada de *C. difficile* en una solución tamponada que contiene timerosal al 0,02% como agente preservante. El reactivo se suministra listo para usar. Almacene entre 2 y 8 C cuando no se esté usando.
4. **Conjugado enzimático*:** Una mezcla de anticuerpos policlonales de cabra contra las Toxinas A y B conjugados con peroxidasa de rábano en una suspensión proteica tamponada que contiene gentamicina y timerosal al 0,02%. Almacene entre 2 y 8 C cuando no se esté usando.
5. **Immunocard Tampón de Lavado I*:** Una solución tamponada que contiene timerosal al 0,01% como agente preservante. Almacene entre 2 y 8 C cuando no se esté usando.
6. **Immunocard Substrato I*:** Una solución tamponada que contiene tetra-metil-bencidina y peróxido. Almacene entre 2 y 8 C cuando no se esté usando.
7. Pipetas de transferencia plásticas con marcas para 25 µL y 150 µL.

* En vial plástico con gotero. Listo para usar.

MATERIALES NO PROPORCIONADOS
1. Guantes de látex desechables que deberían usarse mientras se manejan las muestras de materia fecal ya que éstas se consideran materia biológico potencialmente nocivo
2. Mezcle en un vórtex para lograr una suspensión de la muestra de materia fecal en el Diluente de Muestra
3. Cronómetro de intervalos
4. Palillos aplicadores
5. Tubos de ensayo, 10 x 75 mm ó 12 x 75 mm

PRECAUCIONES
1. **Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.**
2. **No almacenar a temperaturas superiores a 2-8 C. No congelar.**
3. **No desviarse del método establecido en el inserto puesto que pueden ocurrir resultados positivos falsos o negativos falsos.**
4. **Algunas muestras de pacientes contienen agentes infecciosos, por lo tanto, todas las muestras de los pacientes deben manejarse y desecharse como si fueran materia biológico nocivo.**
5. **No se deben intercambiar reactivos de kits provenientes de distintos números de lote. No use componentes de kits después de la fecha de expiración marcada en la etiqueta del kit.**
6. **Todas las muestras de materia fecal deben mezclarse minuciosamente antes de realizar el test independientemente de cual sea su consistencia, con el objeto de asegurar la obtención de una muestra representativa antes de realizar el test.**
7. **El no hacer que las muestras y reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-26 C) antes de hacer el test puede disminuir la sensibilidad de la prueba.**
8. **Revise las Tarjetas del Test antes de sacarlas de la bolsa de aluminio. No utilice tarjetas de Test cuya envoltura estuviera agujereada o en las cuales la envoltura no ha sido sellada por completo. No utilice Tarjetas del Test si el indicador del desecante ha cambiado de color azul a color rosado. Pueden ocurrir reacciones negativas falsas por causa del deterioro de las Tarjetas de Test que no han sido almacenadas apropiadamente.**
9. **No utilice el Diluyente de Muestra o el Control Positivo si estos están decolorados o turbios. La decoloración o turbidez pueden ser una señal de contaminación microbiana. Es normal que el Immunocard Tampón de Lavado I tenga una apariencia ligeramente túrbida.**
10. **El Immunocard Substrato I es sensible a la luz y debe almacenarse en lo oscuro. El reactivo debe tener una apariencia entre incolora y ámbar claro. Si el reactivo presenta un color azul debe descartarse.**
11. **Con el objeto de asegurar consistencia en el tamaño y administración de la gota mantenga los viales de reactivos en posición vertical al dispensar las gotas.**

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

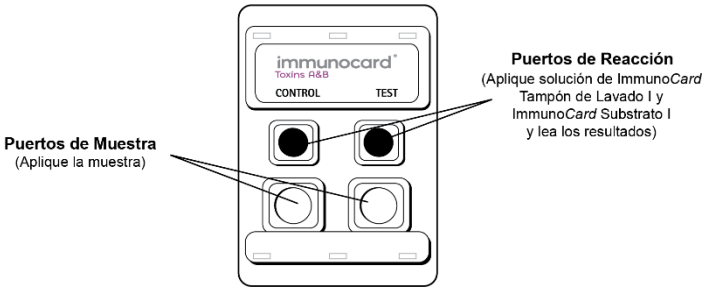
 ImmunoCard Wash Buffer I	**Palabra de advertencia** Peligro Contiene Imidazole **Indicaciones de peligro** H315 - Provoca irritación cutánea H319 - Provoca irritación ocular grave H360D - Puede dañar al feto **Consejos de prudencia - UE (§28, 1272/2008)** P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver Section 4 en esta etiqueta). P264 - Lavarse la cara, las manos y las áreas de la piel expuestas concienzudamente tras la manipulación. P280 - Llevar gafas/ máscara de protección. P337 + P313 - Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. P201 - Solicitar instrucciones especiales antes del uso. P202 - No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. P280 - Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P308 + P313 - EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra de materia fecal debe transportarse en un recipiente hermético y almacenarse entre 2-8 C hasta que sea analizada. La muestra debe analizarse lo más pronto posible, pero puede mantenerse entre 2-8 C hasta por un máximo de 96 horas antes de analizarse. Si no se puede analizar durante este período de tiempo, las muestras deben congelarse inmediatamente se reciben y almacenarse congeladas a (≤ -20 C) hasta analizarse. Las muestras pueden congelarse y descongelarse dos veces.

NOTAS PARA EL PROCEDIMIENTO

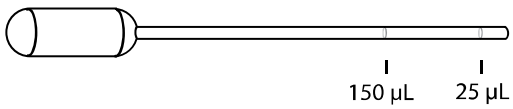
1. En el diagrama de abajo se muestra el formato de la Tarjeta de Prueba Immunocard.



2. El procesamiento en serie de cualquier número de muestras o controles es posible siempre y cuando **por cada tarjeta** se mantengan los pasos apropiados, la secuencia de adición de los reactivos, el tiempo de espera durante la incubación y los tiempos de lectura de los resultados. Cada paso del procedimiento debe completarse con cada muestra antes de que se comience el paso siguiente.
3. El lado de **Control** (izquierdo) de cada tarjeta proporciona un control interno para cada muestra. Esto evalúa cada muestra individualmente para una dilución suficiente y funcionamiento de los reactivos.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

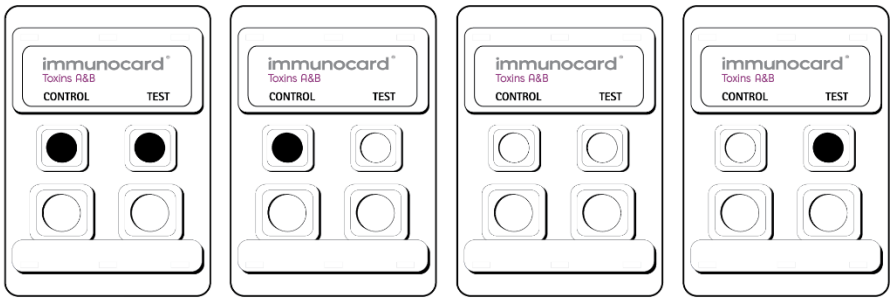
1. Permita que las tarjetas de test, los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente (20-26 C) antes de realizar el test. Saque los reactivos de la caja del kit para que se aclimaten. **Después de refrigerarse los reactivos pueden tomarse hasta 60 minutos para aclimatarse. REGRESE A 2-8 C INMEDIATAMENTE LUEGO DE USARSE.**
2. Por cada paciente que va a analizarse marque un tubo de ensayo.
3. Añada 200 µL de Diluyente de Muestra al tubo de ensayo usando el gotero de la botella.
4. Añada 3 gotas de Conjugado Enzimático (150 µL) por cada tubo. Mezcle los tubos con un vórtex.
5. Inmediatamente añada la materia fecal, el caldo de cultivo o la muestra de control de la siguiente manera:
   a. **Materias fecales líquidas o semi-sólidas:** mezcle la muestra de materia fecal concienzudamente. Utilizando una pipeta de transferencia limpia (esta está incluida con el kit) aspire la materia fecal hasta la primera marca (25 µL) desde la punta de la pipeta. Dispense la materia fecal dentro de la mezcla de Diluente y Conjugado. Use la misma pipeta para mezclar la muestra de materia fecal aspirando cuidadosamente y luego dispensando la suspensión varias veces. Mezcle con un vórtex durante 10 segundos la mezcla final. Deje la pipeta dentro del tubo para usar en el test más tarde.*



   b. **Materias fecales sólidas:** mezcle la muestra de materia fecal concienzudamente. Usando un palillo de madera transfiera una pequeña porción —aproximadamente de 2 mm de diámetro— de la muestra de materia fecal dentro de la mezcla de Diluyente y Conjugado. Emulsifique la muestra usando el palillo aplicador y luego mezcle concienzudamente en un vórtex durante 10 segundos. Coloque una pipeta dentro del tubo y déjela allí para usar más tarde en el test. *
   c. **Control opcional:** Usando los goteros de los recipientes añada 1 gota del Control Positivo o del Control Negativo (Diluyente de Muestras) que se proporcionan con este kit a la mezcla de Diluyente y Conjugado. Mezcle en un vórtex durante 10 segundos. Coloque una pipeta dentro del tubo y déjela allí para usar más tarde en el test.

   ***NOTA: La transferencia de muy poca muestra, o el no mezclar y suspender por completo la muestra en la mezcla de Diluyente y Conjugado puede ocasionar un resultado negativo falso. La adición de muestra de materia fecal en exceso puede ocasionar resultados inválidos por causa de una restricción en el flujo de la muestra.**
6. Deje reposar cada muestra diluida durante cinco minutos y 24 horas a una temperatura de 20-26 C. Selle el tubo que contiene la muestra diluida, o control, si incuba más de 6 minutos.
7. Use una Tarjeta de Prueba Immunocard por cada muestra o control. Saque el número apropiado de Tarjetas de Prueba Immunocard de su bolsa de papel metálico. Deseche la bolsa y el desecante. Marque el dispositivo con el nombre del paciente o del control.
8. Mezcle cada muestra o control con un vórtex durante 10 segundos antes de usarlos.
9. Añada 150 µL (la segunda marca en la pipeta de transferencia representa 150 µL) de cada muestra o de cada control a cada uno de los puertos de muestra en una tarjeta de prueba.
10. Incube durante 5 ± 1 minutos a una temperatura de 20-26 C. NOTA: Al final de la incubación ambos puertos de reacción deben verse completamente mojados. Si cualquiera de los puertos de reacción no está completamente mojado deseche la Tarjeta de Prueba y repita el procedimiento. Proceda con el análisis si la muestra permanece en los puertos de muestra a pesar de que ambos puertos de reacción se ven completamente mojados.
11. Sostenga el vial de Immunocard Tampón de Lavado I verticalmente y dispense exactamente 3 gotas a cada uno de los puertos de reacción.
12. Cuando el Immunocard Tampón de Lavado I se haya absorbido completamente añada exactamente tres gotas de de Immunocard Substrato I
13. Incube la tarjeta de test durante 5 minutos entre 20-26 C.
14. **Lea los resultados de cada tarjeta visualmente dentro de los primeros 30 segundos después de la incubación.**

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



PARA INTERPRETAR LOS RESULTADOS SOLAMENTE LEA LOS PUERTOS DE REACCIÓN SUPERIORES.

NOTA: No tenga en cuenta el desarrollo de color en los puertos de muestra. El color de los puertos de muestra no se evalúa durante el análisis.

Resultado positivo para la prueba: Color azul en los puertos de reacción de TEST (superior derecho) y de CONROL (superior izquierdo). La intensidad del color azul en el puerto de TEST puede variar desde la parte inferior hasta la parte superior del puerto. Un resultado positivo en el test indica que la Toxina A y La Toxina B o solamente la Toxina B está/están presente en la muestra. POR FAVOR TENGA EN CUENTA QUE: El puerto de TEST puede aparecer menos azul que el puerto de CONTROL.

Resultado negativo para la prueba: Color azul solamente en el puerto de reacción de CONTROL. El puerto de reacción de TEST (superior derecho) debe verse incoloro. (El pozo del TEST puede verse gris claro, debido a la membrana estar mojada.) Un resultado negativo en el test indica que las toxinas de *C. difficile* no están presentes o que están por debajo del límite de detección de la prueba.

Resultados inválidos del test:
1. No hay un color azul detectable en el puerto de reacción de CONTROL. Una falla en el CONTROL invalída cualquier resultado. El test inválido puede deberse a: la falla de un reactivo o de la Tarjeta de Prueba para funcionar apropiadamente, a no haber añadido la muestra, a que la muestra no migró, o a que la muestra no fue diluida apropiadamente ocasionando una sobre inoculación de la Tarjeta de Prueba. Las muestras con niveles de toxinas extremadamente altos también pueden presentar un TEST positivo a pesar de un negativo en el puerto de CONTROL.
2. Un anillo de color azul sobre el marco de plástico alrededor del TEST (superior izquierdo) durante el procedimiento del test.

Cuando se obtienen resultados inválidos, vuelva a diluir la muestra y repita el test en una tarjeta nueva.

CONTROL DE CALIDAD
Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.
Cada Tarjeta de Prueba contiene un control interno. La aparición de un color azul en el puerto de reacción de CONTROL verifica que la prueba estaba activa en el momento en que se usó, que la muestra fue añadida y que hubo migración adecuada de la muestra.

La reactividad de cada lote nuevo y cada embarque de la prueba Immunocard Toxins A & B debe ser verificada al recibirlo o antes de usarlo. El reactivo de Control Positivo se suministra con el kit. El control se usa para verificar la reactividad de los otros reactivos en el ensayo, pero su intención no es asegurar la precisión analítica del ensayo. El Diluyente de Muestra se usa para el control negativo. Se pueden realizar test adicionales con los controles para cumplir con los requisitos de las regulaciones locales, estatales y/o federales, y/o para cumplir con las organizaciones acreditadoras. Los resultados que se esperan ver con los controles están descritos en la sección INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS. La Tarjeta de Prueba no debe usarse si los test de control no producen los resultados correctos. Lograr los resultados esperados en el puerto de Control, Control Positivo y Control Negativo (Diluyente de Muestra) sirve como indicador que el test funcionó adecuadamente, los anticuerpos en la membrana y el conjugado estaban activos al momento de correr la prueba y la membrana soportó adecuadamente el flujo de la muestra. Si los controles internos y externos no dan los resultados esperados esto sugiere que la prueba no fue ejecutada incorrectamente (e.i. se añadió el volumen de reactivo incorrecto, se usó la temperatura o el tiempo de incubación erróneo, o los reactivos no estaban a temperatura ambiente antes de usarse). **Si los resultados esperados para el control no son observados, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Tecnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.**

VALORES ESPERADOS
La frecuencia de la diarrea asociada a antibióticos causada por *C. difficile* depende de varios factores incluyendo la población de pacientes, el tipo de institución y la epidemiología. La incidencia que se reporta de enfermedad causada por *C. difficile* en pacientes con enfermedad asociada a antibióticos es de 15-20%, aunque diferentes facilidades pueden encontrar niveles de positividad fuera de esta gama.[2, 3, 5] No se espera un resultado positivo de un paciente no infectado.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO
1. La prueba es cualitativa y no se deben tomar interpretaciones cuantitativas con relación a la banda positiva cuando se reportan los resultados. La prueba debe ser usada en conjunto con la información clínica disponible del paciente y otros procedimientos diagnósticos.
2. El ensayo Immunocard Toxins A & B detecta la presencia de toxina A y B en la materia fecal del paciente. No se ha demostrado que el nivel de toxina se correlacione con la presencia o severidad de la enfermedad. Los resultados del ensayo deberán ser interpretados por un médico, a la luz de otros resultados de laboratorio y hallazgos clínicos.[1]
3. El único microorganismo que se ha comprobado que da reactividad cruzada con el test es un aislado altamente toxigénico de *C. sordellii*.[3]
4. La ejecución en muestras pedriatricas no a sido evaluada.
5. Se han identificado dos grupos, los cuales llevan *C. difficile* de forma asintomática en altos niveles. Colonización a niveles de 50% o más han sido reportados en infantes[3] y niveles hasta 32% en pacientes con fibrosis quística.[4]
6. Aunque relativamente estable a 2-8 C, las toxinas de *C. difficile* – en concentraciones bajas particularmente – se degradan fácilmente a temperatura ambiente. La velocidad a la que las toxinas se degradan varia de muestra a muestra, de manera que no puede predecir el degrado. Por esta razón, la mejor practica requiere que la muestra sea refrigerada o congelada dentro de dos horas de la colección y la muestra sea corrida dentro del tiempo recomendado en este inserto. No deben aceptar muestras que no han sido coleccionadas, manejadas o transportadas adecuadamente.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO
Estudios comparativos
Tres laboratorios independientes ensayaron muestras en paralelo con la prueba Immunocard Toxins A & B y un método de referencia de diagnóstico in vitro de citotoxina.

Muestras Prospectivas	**ICTAB**		
	Pos	**Neg**	**Total**
Citotoxina Pos	67	5	72
Citotoxina Neg	2	176	178
Total	69	181	250

		95% CI
Sensitividad Clínica	67/72 (93,1%)	87,1-98,9%
Especificidad Clínica	176/178 (98.,9%)	97,6-100%
Valor positivo predecible	67/69 (97,1%)	92,9-100%
Valor negativo predecible	176/181 (97,2%)	94,5-99,5%

Muestras Retrospectivas	**ICTAB**		
	Pos	**Neg**	**Total**
Citotoxina Pos	33	0	33
Citotoxina Neg	5	303	308
Total	38	303	341

		95% CI
Sensitividad Clínica	33/33 (100%)	N/A
Especificidad Clínica	303/308 (98,4%)	96,4-99,6%
Valor positivo predecible	33/38 (86,8%)	76,2-97,8%
Valor negativo predecible	303/303 (100%)	N/A

LIMITE DE DETECCION
El límite de detección inferior de esta prueba es de 3 ng/mL de materia fecal para toxina A y toxina B.

REPRODUCIBILIDAD
La reproducibilidad de Immunocard Toxins A & B fue determinada con muestras conocidas negativas (n=2) y positivas (n=6), las cuales fueron corridas sin marcas o identificación. Dos de las muestras positivas estaban cerca del limite de detección de la prueba. Las muestras de reproducibilidad se corrieron en tres días consecutivos y en tres instituciones independientes. Las muestras produjeron los resultados esperados 100% del las veces.

ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA
Se evaluó la especificidad de la prueba Immunocard Toxins A & B utilizando las siguientes cepas de bacterias, virus y levaduras. Las muestras positivas y negativas fueron inyectadas con una cantidad de ≥ 1 x 10^8 bacterias/mL o levaduras. Ninguno de los microorganismos evaluados dió un resultado positivo en las muestras de materia fecal negativas ni interfirió con la detección de las muestras de materia fecal positivas: Adenovirus 40, Adenovirus 41, *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum, nontoxigenic C. difficile* (10 cepas), *Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* cepa 9714, *Clostridium sporogenes, Enterobacter cloacae, Escherichia coli* (Cuatro cepas incluyendo dos cespas de O157:H7), *Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Porphyromonas asaccharolytica, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa,* Rotavirus, *Salmonella typhimurium, Serratia liquefaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* Cowan I, *Staphylococcus epidermidis, Streptococcus faecalis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica.* El unico microorganismo no-*C. difficile* que reacciono con la prueba Immunocard Toxins A & B que *C. sordellii* VPI 9048. Esta sepa produce Toxinas A & B homologa a HT y LT.

PRUEBAS PARA SUBSTANCIAS INTERFERENTES
Se encontró que las siguientes substancias no tenían ningún efecto sobre los resultados cuando estaban presentes en la materia fecal a las concentraciones indicadas: Metronidazole (0,25% w/v), Vancomycin (0,25% w/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), Sulfato de bario (5% w/v), Sangre total (40% v/v), Mucina (3,5% w/v), Grasa fecal (4,8% w/v), Imodium AD® (5% w/v), Kaopectate® Caplets (5 mg/mL).

Información adicional con relación a las características de ejecución de este producto pueden ser obtenidas contactando el Departamento de Servicios Técnicos al (800) 343-3858 de asistencia (USA) o su distribuidor local.

DEUTSCH

immunocard®
Toxins A&B

Ein schneller Enzym-Immunoassay für den Nachweis der *Clostridium difficile*-Toxine A und B in Stuhlproben

REF **712050** IVD **Rx Only**

VERWENDUNGSZWECK
Immunocard Toxins A & B ist ein schneller qualitativer Enzym-Immunoassay (EIA) mit horizontaler Flussrichtung für den Nachweis der *Clostridium difficile*-Toxine A und B in Humanstuhl. Dieser Test wird als Unterstützung bei der Diagnose von mit *C. difficile* assoziierten Erkrankungen eingesetzt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS
In entwickelten Ländern ist toxigenes *Clostridium difficile* der Haupterreger nosokomialer infektiöser Diarrhöe. Allein in US-Krankenhäusern werden jährlich schätzungsweise 300.000 Fälle von *Clostridium-difficile*-assoziierter Diarrhöe (engl.: *C. difficile* associated disease, Abkürzung: CDAD) registriert.[1, 2] In ca. 25 % aller Fälle von antibiotika-assoziierter Diarrhöe ist *Clostridium difficile* die primäre Ursache. Nahezu jedes Antibiotikum kann einen Patienten für CDAD anfällig machen. Das klinische Erscheinungsbild bei CDAD reicht von asymptomatischer Kolonisation bis hin zu lebensgefährlicher pseudomembranöser Kolitis und toxischem Megakolon.[2] Die meisten pathogenen *C. difficile*-Stämme produzieren zwei in biologischer und immunologischer Hinsicht unterschiedliche Toxine: Toxin A (Enterotoxin) und Toxin B (Zytotoxin). Früher nahm man an, dass Toxin A für die meisten CDAD-Fälle beim Menschen verantwortlich sei, bis in den späten 90er Jahren Berichte über klinisch relevante Erkrankungen erschienen, die durch *C. difficile*-Stämme verursacht wurden, welche lediglich Toxin B produzierten.[1] Der insgesamt genaueste Assay für den Nachweis von *C. difficile* ist der Zytotoxin-Assay. Diese Methode erfordert jedoch Gewebekultur-Einrichtungen sowie eine 48- bis 72-stündige Inkubation und ist nicht standardisiert.[2] Der Einsatz eines Schnelltests, wie Immunocard Toxins A & B ermöglicht dem Arzt die rasche Bestätigung einer Infektion, die Einleitung der entsprechenden Behandlung, sowie die Ergreifung enterischen Erkrankungen vorbeugender Isolierungsmaßnahmen im Krankenhausbereich.[2]

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN
Immunocard Toxins A & B besteht aus einer Membran in einem Kunststoffrahmen mit zwei Probenöffnungen und zwei Reaktionsöffnungen. Die Membran leitet immobilisierte Antikörper zu den Toxinen A und B. Das Enzymkonjugat-Reagenz besteht aus Antikörpern gegen die Toxine A und B, gebunden an Meerrettichperoxidase. Für die Testdurchführung wird eine Stuhlprobe des Patienten mit Probendiluent und Enzymkonjugat vermischt. Das Gemisch kann in einem Zeitraum von fünf Minuten bis 24 Stunden inkubieren. Während dieser Inkubation werden evtl. vorhandene Toxinmoleküle an die Anti-Toxin-Antikörper des Konjugats gebunden. Anschließend wird jeweils eine Teilmenge des Gemischs in die beiden Probenöffnungen des Tests gegeben. Der Test wird weitere fünf Minuten lang bei 20–26 C inkubiert. Während dieser zweiten Inkubation, wird der Toxin-Konjugat-Komplex von Feststoffen getrennt, während der flüssige Anteil der Probe durch die Membran zu den als „TEST“ und „CONTROL“ (Kontrolle) ausgewiesenen Reaktionsöffnungen fließt. Die Toxin-Konjugat-Komplexe werden sodann an der als „TEST“ ausgewiesenen Reaktionsöffnung durch immobilisierte Anti-Toxin-Antikörper in der Reaktionsmembran erfasst. (Die zweite Reaktionsöffnung dient als interne Kontrolle). Anschließend werden beide Reaktionsöffnungen mit Immunocard Waschpuffer I gespült, um Störungen durch Proteinkontaminierungen vor der Zugabe des Immunocard Substrat I zu reduzieren. Die Reaktionsöffnungen werden weitere fünf Minuten lang inkubiert. Während dieser Zeitspanne wird das Immunocard Substrat I durch das Enzymkonjugat modifiziert, wobei sich eine blaue Färbung ergibt. Die Reaktionen werden visuell ausgewertet. Die Ausbildung einer blauen Färbung in der „TEST“-Reaktionsöffnung bedeutet, dass der Test positiv ist. In der „CONTROL“-Öffnung werden die Anti-Toxin-Antikörper des Konjugats direkt an das immobilisierte Toxin gebunden. Die Ausbildung einer blauen Färbung in der „CONTROL“-Reaktionsöffnung bedeutet, dass Probe hinzugegeben wurde, dass die Reagenzien zum Verwendungszeitpunkt aktiv waren, und dass die Probenmigration korrekt ablief.

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN
Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Außenseite der Packung angegeben.
1. **Immunocard Toxins A & B Testkarte:** Ein in einem Kunststoffrahmen befindliches Membrankissen, in einem verschlossenen Folienbeutel mit Trockenmittel. Das Kissen enthält immobilisierte monoklonale Anti-Toxin-A-Antikörper und polyklonale Anti-Toxin-B-Antikörper (Ziege) an der „TEST“-Reaktionsöffnung sowie *C. difficile*-Toxin an der „CONTROL“ Reaktionsöffnung. Testkarten bis zum Gebrauch bei 2–8 C lagern.
2. **Probendiluent*:** Eine gepufferte Proteinlösung mit Gentamicin und Thimerosal (0,02 %) als Konservierungsmittel. Bis zum Gebrauch bei 2–8 C lagern.
3. **Positive Kontrolle*:** Inaktiviertes *C. difficile*-Rohtoxin in einer gepufferten Lösung mit Thimerosal (0,02 %) als Konservierungsmittel. Das Reagenz wird gebrauchsfertig geliefert. Bis zum Gebrauch bei 2–8 C lagern.
4. **Enzymkonjugat*:** Eine Mischung aus polyklonalen Antikörpern (Ziege) gegen die Toxine A und B, konjugiert an Meerrettichperoxidase und suspendiert in einer gepufferten Proteinlösung mit Gentamicin und Thimerosal (0,02 %). Bis zum Gebrauch bei 2–8 C lagern.
5. **Immunocard Waschpuffer I*** Eine gepufferte Lösung mit Thimerosal (0,01 %) als Konservierungsmittel. Bis zum Gebrauch bei 2–8 C lagern.
6. **Immunocard Substrat I*:** Eine gepufferte Lösung mit Tetramethylbenzidin und Peroxid. Bis zum Gebrauch bei 2–8 C lagern.
7. Transferpipetten aus Kunststoff mit Markierungen für 25 µL und 150 µL.

***** In Tropferfläschchen aus Kunststoff. Im Lieferzustand zu verwenden.

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN
1. Einmal-Handschuhe aus Latex, die beim Umgang mit Stuhlproben getragen werden sollten, da derartige Proben potenziell biogefährlich sind
2. Vortexmischer für das Suspendieren der Stuhlproben im Probendiluent
3. Intervallzeitgeber
4. Applikatorstäbchen
5. Kleine Teströhrchen (10 x 75 mm oder 12 x 75 mm)

VORSICHTSMASSNAHMEN
1. **Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.**
2. **Nicht bei Temperaturen über 2–8 C lagern. Nicht einfrieren.**
3. **Abweichungen von der etablierten Methode der Packungsbeilage können zu falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnissen führen.**
4. **Manche Patientenproben können Krankheitserreger enthalten. Daher sind alle Patientenproben als potenziell biogefährliche Substanzen zu handhaben und zu entsorgen.**
5. **Testkarten, Enzymkonjugat und Positivkontrolle aus Testkits verschiedener Chargennummern NICHT gegeneinander austauschen. Die anderen Reagenzien (das Probendiluent, der Immunocard Waschpuffer I und das Immunocard Substrat I) sind kitchargenübergreifend verwendbar solange das Verfallsdatum nicht abgelaufen ist. Die Kitkomponenten nicht über das in der Kitkennzeichnung angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.**
6. **Alle Stuhlproben ungeachtet ihrer Konsistenz vor dem Testen gut mischen, um repräsentative Proben zu gewährleisten.**
7. **Werden Proben und Reagenzien vor dem Testen nicht auf Zimmertemperatur (20–26 C) gebracht, kann dies die Assay-Empfindlichkeit beeinträchtigen.**
8. **Vor dem Entfernen des Folienbeutels die Testkarten inspizieren. Testkarten, deren Folienbeutel Löcher aufweisen bzw. deren Folienbeutel nicht vollständig verschlossen sind, nicht verwenden. Testkarten, deren Trockenmittelindikator von Blau nach Rosa umgeschlagen ist, nicht verwenden. Der Zerfall unsachgemäß gelagerter Testkarten kann zu falsch-negativen Reaktionen führen.**
9. **Probendiluent oder positive Kontrolle nicht verwenden, falls sie verfärbt oder trüb aussehen. Verfärbung oder Trübheit kann ein Anzeichen einer mikrobiellen Kontaminierung sein. Ein leicht trübes Aussehen des Immunocard Waschpuffers I ist normal.**
10. **Das Immunocard Substrat I ist lichtempfindlich und im Dunkeln zu lagern. Das Reagenz sollte klar und farblos aussehen. Sobald eine Färbung oder Trübung erscheint, soll das Reagenz entsorgt werden.**
11. **Die Reagenzienfläschchen bei der Tropfenabgabe senkrecht halten, um eine einheitliche Tropfengröße und Aufbringung zu gewährleisten.**

GEFÄHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

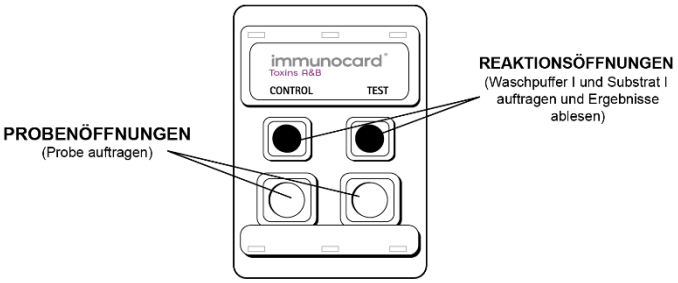
 ImmunoCard Wash Buffer I	**Signalwort** Gefahr Enthält Imidazole **Gefahrenhinweise** H315 - Verursacht Hautreizungen H319 - Verursacht schwere Augenreizung H360D - Kann das Kind im Mutterleib schädigen **Sicherheitshinweise - Verordnung (EG) §28, Nr. 1272/2008** P321 - Besondere Behandlung (siehe Section 4 auf diesem Kennzeichnungsetikett). P264 - Nach Gebrauch Gesicht, Hände und exponierte Haut gründlich waschen. P280 - Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P337 + P313 - Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P201 - Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. P202 - Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. P280 - Schutzhandschuhe/Schutz-kleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P308 + P313 - BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Die Stuhlprobe in luftdicht verschlossenen Behältern transportieren und bis zum Testen bei 2–8 C lagern. Die Probe ist so bald wie möglich zu testen, kann jedoch bei 2–8 C bis zu vier Tage lang aufbewahrt werden. Ist eine Testdurchführung innerhalb dieser Frist nicht möglich, können die Proben unmittelbar nach Eingang eingefroren und bis zum Testen gefroren (bei ≤ -20 C) gelagert werden. Die Proben können bis zu drei Mal eingefroren und aufgetaut werden.

HINWEISE ZUR DURCHFÜHRUNG

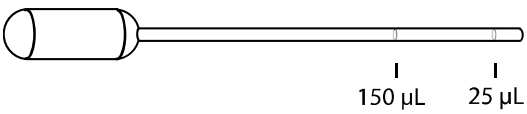
1. Das Format der Immunocard-Testkarten ist im Folgenden dargestellt:



2. Die chargenweise Verarbeitung einer beliebigen Anzahl von Proben oder Kontrollen ist möglich, sofern **für jede Karte** die entsprechenden Schritte durchgeführt und die Reihenfolge der Reagenzienzugabe, die Inkubationsdauer (Wartezeit) und die Zeitspanne bis zur Ergebnisablesung eingehalten werden. Bei jeder Probe muss vor Beginn des jeweils nächsten Schritts der gegenwärtige Verfahrensschritt abgeschlossen sein.
3. Mit der „**Control**"-Seite (links) jeder Karte steht für jede Probe eine interne Kontrolle zur Verfügung. Sie dient zum Testen der einzelnen Proben im Hinblick auf ausreichende Verdünnung und Reagenzienleistung.

TESTDURCHFÜHRUNG

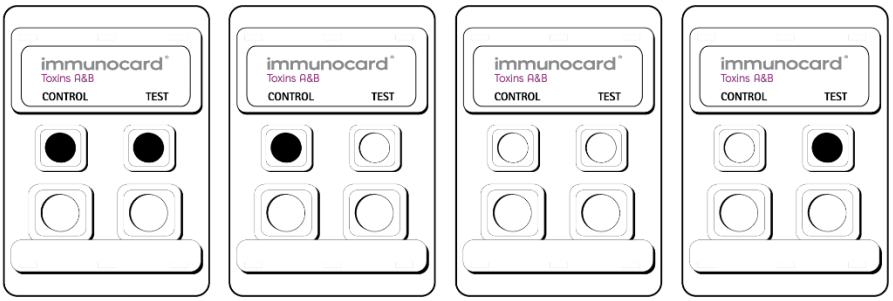
1. Alle Testkarten, Reagenzien und Proben vor dem Testen auf Zimmertemperatur (20-26 C) bringen. Die Reagenzien zum Aufwärmen aus der Kitbox entnehmen. **Das Aufwärmen der Reagenzien nach der Entnahme aus dem Kühlschrank kann bis zu 60 Minuten in Anspruch nehmen. DEN KIT SOFORT NACH GEBRAUCH BEI 2-8 C LAGERN.**
2. Für jede zu testende Patientenprobe ein Teströhrchen beschriften.
3. Mit Hilfe des Fläschchentropfers 200 µL Probendiluent in das Teströhrchen geben.
4. In jedes Röhrchen drei Tropfen Enzymkonjugat (150 µL) geben.
5. Unmittelbar danach folgendermaßen Stuhl oder Kontrollprobe hinzugeben:
   a. **Flüssige/halbfeste Stuhlproben:** Die Stuhlproben gründlich durchmischen. Mit Hilfe einer (im Kit enthaltenen) sauberen Transferpipette den Stuhl bis zur ersten Markierung ab dem Spitzenende (25 µL) aufziehen. Den Stuhl in das Diluent/Konjugat-Gemisch abgeben. Den Stuhl durch behutsames mehrmaliges Aspirieren mit Hilfe derselben Pipette und anschließendes Abgeben der Suspension mischen. Das sich ergebende Gemisch 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer mischen. Die Transferpipette zur späteren Verwendung für den Test im Röhrchen aufbewahren.*



   b. **Geformte/feste Stuhlproben:** Die Stuhlproben gründlich durchmischen. Mit Hilfe eines Applikatorstäbchens aus Holz einen kleinen Teil (ca. 2 mm Durchmesser) des Stuhls in das Diluent/Konjugat-Gemisch transferieren. Die Probe mit Hilfe des Applikatorstäbchens emulgieren und anschließend 10 Sekunden lang gründlich mit dem Vortexmischer mischen. Eine Pipette in das Röhrchen einbringen und zur späteren Verwendung beim Test dort belassen.*
   c. **Optionale Kontrolle:** Mit Hilfe der Behältertropfer einen Tropfen der im Kit enthaltenen positiven Kontrolle oder negativen Kontrolle (Probendiluent) zum Diluent/Konjugat-Gemisch hinzugeben. Mit dem Vortexmischer 10 Sekunden lang mischen. Eine Pipette in das Röhrchen einbringen und zur späteren Verwendung beim Test dort belassen.

   ***HINWEIS: Wird zu wenig Probe transferiert oder wird die Probe nicht vollständig im Diluent/Konjugat-Gemisch vermischt und suspendiert, kann dies zu einem falsch-negativen Testergebnis führen. Die Zugabe einer zu großen Stuhlprobenmenge kann auf Grund eingeschränkten Probenflusses zu ungültigen Ergebnissen führen.**
6. Jede verdünnte Probe 5 Minuten bis 24 Stunden bei 20–26 C ruhen lassen. Soll die Inkubation länger als 6 Minuten dauern, das Röhrchen mit der verdünnten Probe oder Kontrolle verschließen.
7. Für jede Probe oder Kontrolle jeweils eine Immunocard-Testkarte verwenden. Wenn Sie für den Test bereit sind, entnehmen Sie die Immunocard-Testkarte aus dem Folienbeutel. Beutel und Trockenmittel entsorgen. Die Testkarte mit dem Namen des Patienten bzw. der Kontrolle beschriften.
8. Jede Probe bzw. Kontrolle vor deren Benutzung 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer mischen.
9. In jede der 2 Probenöffnungen einer Testkarte 150 µL jeder verdünnten Probe oder Kontrolle geben. (Die zweite Markierung der Transferpipette entspricht 150 µL.)
10. Bei 20–26 C 5 ± 1 Minuten lang inkubieren. HINWEIS: Nach der Inkubation müssen beide Reaktionsöffnungen vollständig nass aussehen. Sollte eine der Reaktionsöffnungen nicht vollständig nass sein, die Testkarte entsorgen und das Verfahren wiederholen. Mit dem Testen fortfahren, falls noch Probe in den Probenöffnungen vorliegt, beide Reaktionsöffnungen jedoch vollständig nass sind.
11. Das Immunocard Waschpuffer I-Fläschchen senkrecht halten und exakt 3 Tropfen in jede der Reaktionsöffnungen abgeben.
12. Nachdem das Immunocard Waschpuffer I vollständig absorbiert ist, das Fläschchen senkrecht halten und exakt 3 Tropfen Immunocard Substrat I hinzugeben.
13. Die Testkarte 5 Minuten lang bei 20–26 C inkubieren.
14. **Die Ergebnisse jeder Karte innerhalb von 30 Sekunden nach Inkubationsende visuell ablesen.**

AUSWERTURN DER ERGEBNISSE



FÜR DIE ERGEBNISINTERPRETATION NUR DIE OBEREN REAKTIONSÖFFNUNGEN ABLESEN

HINWEIS: Farbentwicklungen in den Probenöffnungen ignorieren. Die Farbe der Probenöffnungen wird beim Testen nicht untersucht.

Positives Testergebnis: Blaue Färbung in den Reaktionsöffnungen „TEST“ (rechts oben) und „CONTROL“ (links oben). Die Stärke der Blaufärbung der „TEST“-Öffnung kann zwischen unterem und oberem Bereich der Öffnung schwanken. Ein positives Testergebnis bedeutet, dass die Probe Toxin A und/oder B enthält. ZUR BEACHTUNG: Die „TEST“-Öffnung erscheint u.U. weniger blau, als die „CONTROL“-Öffnung.

Negatives Testergebnis: Blaue Färbung nur in der „CONTROL“-Reaktionsöffnung (links oben). Die „TEST“-Reaktionsöffnung (rechts oben) sollte farblos sein. (Die Benetzung der Membran kann die „TEST“-Öffnung leicht grau erscheinen lassen). Ein negatives Testergebnis bedeutet, dass *C. difficile*-Toxine nicht vorliegen bzw. nur in Mengen unterhalb der Assay-Nachweisgrenze. Manchmal kann sich in der „TEST“ Reaktionsöffnung (rechts oben) eine leicht-bläuliche Färbung an der linken oder rechten Seite zeigen, während der Rest der Öffnung keine Färbung aufweist. Dieses Ergebnis ist als negativ zu erachten.

Ungültige Testergebnisse:
1. Keine erkennbare Blaufärbung in der „CONTROL“-Reaktionsöffnung. „CONTROL“-Versagen macht jedes Testergebnis ungültig. Ein ungültiger Test kann sich aus Reagenzienversagen oder aus einer Fehlfunktion der Testkarte ergeben, ebenso kann er sich aus der Unterlassung der Probenzugabe ergeben, oder weiterhin auch aus dem Ausbleiben der Probenmigration, oder aus einer inkorrekten Probenverdünnung und einer sich hieraus ergebenden zu starken Inokulation der Testkarte. Proben mit extrem hohen Toxinkonzentrationen können ebenfalls ein positives „TEST“-Ergebnis bei negativem „CONTROL“-Ergebnis zeigen.
2. Ein blauer Ring am Kunststoffrahmen um die „TEST“-Öffnung (oben rechts) während des Testverfahrens.

Werden ungültige Ergebnisse erzielt, die Probe erneut verdünnen und den Test mit einer neuen Karte wiederholen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Führen Sie den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durch.

Jede Testkarte umfasst eine interne Kontrolle. Die Ausbildung einer blauen Färbung in der „CONTROL“„-Reaktionsöffnung bestätigt, dass der Assay zum Verwendungszeitpunkt aktiv war, dass Probe hinzugegeben wurde, und dass die Probe ausreichend migrierte.

Die Reaktivität jeder neuen Kitcharge oder jeder neuen Lieferung des Immunocard Toxins A&B Tests soll bei Erhalt oder vor dem Gebrauch überprüft werden. Ein positives Kontrollreagenz ist im Lieferumfang des Kits enthalten. Die Kontrolle dient zur Überprüfung der Reaktivität der anderen Reagenzien in Verbindung mit dem Test. Sie ist nicht dazu bestimmt, die Präzision des Cut off-Werts des analytischen Tests sicherzustellen. Als negative Kontrolle wird Probendiluent verwendet. Mit den Kontrollen können zusätzliche Tests durchgeführt werden, um den Anforderungen von Lokal-, Landes- und Bundesbehörden und/oder Zulassungsorganisationen zu entsprechen. Die für die Kontrollen zu erwartenden Ergebnisse sind im Abschnitt ERGEBNISINTERPRETATION erläutert. Die Testkarte nicht verwenden, falls die Kontrolltests nicht die entsprechenden Ergebnisse erbringen. Korrekte Ergebnisse, die mit der „Control“-Reaktionsöffnung, mit der positiven Kontrolle und mit der negativen Kontrolle (Probendiluent) erhalten wurden, zeigen an, dass der Test korrekt durchgeführt wurde, dass die immobilisierten Antikörper in der Membran und das Enzymkonjugat während des Testablaufs aktiv waren, und dass die Membran einen korrekten Probenfluss ermöglicht. Werden die erwarteten Ergebnisse mit den internen und externen Kontrollen nicht erzielt, lässt dies darauf schließen, dass der Test nicht korrekt durchgeführt wurde. (d. h. das hinzugefügte Reagenzienvolumen war inkorrekt, die Inkubationstemperatur und die Inkubationszeit waren inkorrekt, oder die Reagenzien wurden vor dem Testen nicht auf Zimmertemperatur gebracht). **Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, zur Ermittlung der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Vertriebspartner.**

ERWARTETE WERTE

Die Häufigkeit von antibiotika-assoziierter Diarrhoe durch *C. difficile* ist abhängig von verschiedenen Faktoren, einschließlich der Patientenpopulation, Art der Institution und Epidemiologie. Die berichtete Inzidenz von *C. difficile*-assoziierten Erkrankungen bei Patienten mit Verdacht einer antibiotika-assoziierten Erkrankung liegt bei 15-20 %, obwohl unterschiedliche Einrichtungen Positivraten finden können, die über oder unter diesem Bereich liegen.[2, 3, 5] Ein positives Ergebnis bei einem nicht infizierten Patienten ist nicht zu erwarten.

EINSCHRÄNKUNGEN
1. Dies ist ein qualitativer Test, weshalb bei der Ergebnisausgabe keine quantitative Interpretation der Farbintensität erfolgt.
2. Ein positiver Test bestätigt lediglich das Vorliegen von Toxin A und/oder Toxin B. Die Testergebnisse sollten von einem Arzt unter Berücksichtigung anderer diagnostischer Ergebnisse und des klinischen Zustands des Patienten interpretiert werden. Die Toxinkonzentration korreliert nicht immer unmittelbar mit dem Vorliegen und dem Schweregrad der Erkrankung.[1]
3. *C. sordellii*-Isolate können aufgrund der immunologischen Identität der *C. sordelli*-Toxine eine Testreaktion bewirken.[3]
4. Die Leistung mit Proben von pädiatrischen Patienten wurde nicht evaluiert.
5. Es wurden zwei deutliche Gruppen identifiziert, die sehr häufig asymptomatische Träger von *C. difficile* sind. Bei Säuglingen[3] wurden Besiedlungsraten bis zu 50 % und mehr festgestellt und bei Patienten mit Mukoviszidose Raten bis zu 32 %.[4]
6. Obwohl relativ stabil bei 2-8 C, können die Toxine von *C. difficile* sich bei Raumtemperatur, besonders bei schwacher Konzentration, leicht zersetzen. Die Geschwindigkeit der Toxin-Beschädigung ist von einer Patientenprobe zu anderen unterschiedlich. Die Geschwindigkeit der Toxin-Zersetzung ist daher nicht vorhersehbar. Aus diesem Grund sollten die Proben in den folgenden zwei Stunden nach Probenabnahme gekühlt oder eingefroren werden. Die Proben sollten in dem in dieser Packungsbeilage empfohlenen Zeitraum getestet werden. Testen Sie keine Proben, die nicht korrekt entnommen, gehandhabt oder transportiert wurden.

LEISTUNGSMERKMALE

Vergleichende Studien

Drei unabhängige Labors führten Tests an Proben unter Verwendung des Immunocard Toxins A & B Tests und eines standardmäßigen Zell-Zytotoxizitäts-Assays (mit Neutralisation) durch. Die Ergebnisse der parallel durchgeführten Tests sind im Folgenden aufgeführt.

Prospektive Proben	**ICTAB**		
	Pos	**Neg**	**Gesamt**
Zytotoxin Pos (Std)	67	5	72
Zytotoxin Neg (Std)	2	176	178
Gesamt	69	181	250

		95 % VI
Klinische Sensitivität	67/72 (93,1 %)	87,1-98,9 %
Klinische Spezifität	176/178 (98,9 %)	97,6-100 %
Positiver Vorhersagewert	67/69 (97,1 %)	92,9-100 %
Negativer Vorhersagewert	176/181 (97,2 %)	94,5-99,5 %

Retrospektive Proben	**ICTAB**		
	Pos	**Neg**	**Gesamt**
Zytotoxin Pos (Std)	33	0	33
Zytotoxin Neg (Std)	5	303	308
Gesamt	38	303	341

		95 % VI
Klinische Sensitivität	33/33 (100 %)	N/A
Klinische Spezifität	303/308 (98,4 %)	96,4-99,6 %
Positiver Vorhersagewert	33/38 (86,8 %)	76,2-97,8 %
Negativer Vorhersagewert	303/303 (100 %)	N/A

TESTEMPFINDLICHKEIT

Die Ermittlungsgrenze liegt etwa bei 3 ng Toxin A und 3 ng Toxin B pro mL Stuhl. Es gibt keine Unterschiede in der Nachweisgrenze bei festen oder flüssigen/halbflüssigen Stuhlproben.

REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit des Immunocard Toxins A & B Tests wurde mit bekannten negativen (n=2) und positiven (n=6) Proben getestet. Um eine Identifizierung dieser Stuhlproben während der Tests zu vermeiden, wurden die Stuhlproben kodiert und randomisiert. Zwei der positiven Proben lagen nah an der Nachweisgrenze des Tests. Drei Labors testeten die Proben an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Die Proben erbrachten zu 100 % die erwarteten Ergebnisse.

TESTSPEZIFITÄT

Stuhlproben, die mit den folgenden mikrobiellen Organismen inokuliert wurden (so dass sich eine Probenkonzentration von ≥ 1 x 10^8 Organismen/mL ergab) reagierten nicht mit dem Immunocard Toxins A & B Test: Adenovirus 40, Adenovirus 41, *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium butyricum,* nicht toxigene *C. difficile* (10 Stämme)*, Clostridium perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (Stamm 9714)*, Clostridium sporogenes, Enterobacter cloacae, Escherichia coli (*vier Stämme einschließlich zweier O157:H7-Stämme*), Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Porphyromonas asaccharolytica, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa,* Rotavirus, *Salmonella typhimurium, Serratia liquefaciens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* Cowan I, *Staphylococcus epidermidis, Streptococcus faecalis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica.* Der einzige mit dem Immunocard Toxins A & B Test reaktive Organismus, bei dem es sich nicht um *C. difficile* Isolate handelte, war *C. sordellii* VPI 9048. Dieser Stamm bildet die Toxine HT und LT, die den *C. difficile*-Toxinen A und B homolog sind.

STÖRSUBSTANZEN-TESTS

Die folgenden Substanzen zeigten bei Vorliegen im Stuhl in den angegebenen Konzentrationen keine Auswirkungen auf die Testergebnisse. Stuhlfette (4,8 % w/v), Vollblut (40 % v/v), Mucin (3,5 % w/v), Metronidazol (0,25 % w/v), Vancomycin (0,25 % w/v), Bariumsulfat (5 % w/v), Imodium AD® (5 % w/v), Kaopectate®-Kapseln (5 mg/mL), Pepto Bismol® (5 % v/v).

Für weitere Informationen in Bezug auf die Leistungsmerkmale dieses Produkts, wenden Sie sich bitte an den technischen Kundendienst von Meridian.

REFERENCES

1. Wilkins T, Lyerly D. *Clostridium difficile* testing: After 20 years, still challenging. J Clin Microbiol 2003;41: 531-534.
2. Mylonakis E, Ryan E, Calderwood S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Arch Int Med 2001;161: 525-533.
3. Lyerly DM, Krivan, HC, Wilkins, TD. *Clostridium difficile.* Its disease and toxins. Clin Microbiol Rev 1988;1:1-18.
4. Pokorny CS, Bye PTP, MacLeod C, Selby WS. Antibiotic-associated colitis and cystic fibrosis. Dig Diseases Sci 1992;37:1464-1468.
5. Bartlett JG. *Clostridium difficile*: Clinical consideration. Rev Infect Dis 1990;12:S243-51.

CE

SN11223 **REV. 06/26**

Manufactured By	Meridian Bioscience, Inc. 3471 River Hills Drive Cincinnati, OHIO - 45244 USA www.meridianbioscience.com Contacts: Main Telephone (+1) 513.271.3700 Customer Service/Orders 800.543.1980 Technical Support Center 800.343.3858 Information Fax: 513.272.5432 Ordering Fax: 513.271.0124 E-mail: info@meridianbioscience.com
EC REP	Meridian Bioscience Europe, SRL Via Dell'Industria 7, 20035 Villa Cortese (Milano) ITALY www.meridianbioscience.com Contacts: Main Telephone (+39) 0331.433636 E-mail: info@meridianbioscience.eu Technical Support: MBE-TechService@meridianbioscience.eu Customer Service/Orders: • For Italian Customers: ordini@meridianbioscience.com • For Distributors / International Customers: Export.CustomerService@meridianbioscience.eu
AUSTRALIAN SPONSOR	Emergo Australia Level 20, Tower II Darling Park 201 Sussex Street Sydney, NSW 2000 Australia
UK Authorised Representative	Launch Diagnostics Limited Lakeview West Crossways Business Park Galleon Boulevard Dartford Kent DA2 6QE United Kingdom
CH REP	**MedEnvoy Switzerland** Gotthardstrasse 28 6302 Zug Switzerland

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE
You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:
Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / chargenbezeichnung	CONTROL −	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunitá Europea / Mandatiare dans la Communauté européanne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
CE	Meridian products carrying the European Conformity (CE) mark fulfill the requirements of Directive 98/79/EC or the Regulation 2017/746 on in-vitro diagnostic medical devices / I prodotti Meridian recanti il marchio di Conformità Europea (CE) soddisfano i requisiti della Direttiva 98/79/CE o del Regolamento 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Les produits Meridian portant la marque de Conformité européenne (CE) sont conformes aux exigences de la Directive 98/79/CE ou du Règlement 2017/746 relatifs aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Los productos de Meridian que llevan la marca de conformidad europea (CE) cumplen los requisitos de la Directiva 98/79/CE o del Reglamento 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Produkte von Meridian mit der CE-Kennzeichnung erfüllen die Anforderungen der EU-Richtlinie 98/79/EG bzw. der Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika	SMP PREP DIL SPE	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 Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünngspuffer befindet
			CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaución: Peligroso / WARNUNG: Risikogefahr
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Numero de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Eingrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabbricanto / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD reservés á l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
Σ	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" test / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitaion / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temmperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjugado enzimático / enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrollttest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / testgarät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration 20X / Soluzione dil lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
Rx Only	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Detection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz
	Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / ne pas utiliser si le paquet est endommagé / No use si el paquete esta dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist	TUBE	Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacio / Leeres Gefäß
2	Single Use Only / Prodotto Monouso / A usage unique / Para Un Solo Uso / nur für die einmalige Anwendung	CH REP	Swiss Authorized Representative / Mandatario svizzero / Mandataire Suisse / Representante Autorizado Suizo / Schweizer Bevollmächtigter

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.