



## A Rapid Enzyme Immunoassay for the Detection of *Clostridium difficile* Antigens in Stool

REF 716050

IVD

Rx Only

### INTENDED USE

ImmunoCard *C. difficile* GDH is a rapid qualitative enzyme immunoassay screening test to detect *Clostridium difficile* antigen, glutamate dehydrogenase, in fecal specimens from persons suspected of having *C. difficile* infection (CDI). This test does not distinguish between toxigenic and non-toxicogenic strains of *C. difficile*. Samples from patients that produce positive results with this test must be further tested with an assay designed to detect toxigenic *C. difficile* strains and assist with the diagnosis of CDI.

### SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

*Clostridium difficile* has become the most important etiologic agent in nosocomial diarrhea worldwide. *C. difficile* infection (CDI) can range from mild diarrhea to life-threatening toxic megacolon. Classic risk factors for nosocomial CDI include antibiotic use and old age. Recently however CDI has been seen more frequently outside the hospital environment without the typical risk factors historically associated with *C. difficile* infection.<sup>1</sup> All strains of *C. difficile* produce glutamate dehydrogenase (GDH), also known as common antigen.<sup>2,3</sup> Some strains of *C. difficile* produce two toxins (toxin A and toxin B) that have both been associated with disease. Strains of *C. difficile* that do not harbor the toxin A and toxin B genes are considered to be non-pathogenic. Non-molecular laboratory approaches to *C. difficile* detection can be divided into two general groups: toxin-based and non-toxin based. Toxin-based assays include enzyme immunoassay (EIA) for toxin A or toxins A and B and cytotoxin, which primarily detects toxin B. Non-toxin based assays such as EIA for *C. difficile* GDH, while inherently more sensitive, must be followed up with testing for toxigenic *C. difficile*.

### BIOLOGICAL PRINCIPLES

ImmunoCard *C. difficile* GDH consists of a membrane held in a plastic frame with two sample ports and two reaction ports. The membrane carries immobilized antibodies to glutamate dehydrogenase. The Enzyme Conjugate Reagent consists of antibodies to glutamate dehydrogenase 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 15 minutes. During the incubation, GDH antigen, if present, is bound to the anti-GDH 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 GDH-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 GDH-conjugate complexes are then captured at the TEST reaction port by immobilized antibodies in the reaction membrane. The second of the two reaction ports serves as an internal control. Both reaction ports are subsequently washed with Wash Reagent to reduce interference by contaminating proteins before Substrate Reagent is added. The reaction ports are incubated for an additional five minutes during which time the Enzyme Conjugate modifies the Substrate Reagent. 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-GDH antibodies of the conjugate bind directly to the immobilized antibodies. 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.

- ImmunoCard *C. difficile* GDH Test Cards:** A membrane pad housed in a plastic frame and enclosed in a foil pouch with a desiccant. The pad carries immobilized polyclonal anti-GDH antibodies at the TEST reaction port and Goat anti-mouse antibodies at the CONTROL reaction port. Store the test cards at 2-8 C when not in use.
- ImmunoCard *C. difficile* GDH Positive Control\*:** *C. difficile* GDH in a buffered protein solution containing 0.1% ProClin® and 0.03% gentamicin as preservatives. Store at 2-8 C when not in use.
- ImmunoCard *C. difficile* GDH Sample Diluent/Negative Control\*:** A buffered protein solution containing 0.03% gentamicin and 0.02% thimerosal as preservatives. Store at 2-8 C when not in use.
- ImmunoCard *C. difficile* GDH Enzyme Conjugate\*:** Monoclonal anti-GDH antibody 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.
- ImmunoCard Wash Buffer I\*:** A buffered solution containing thimerosal (0.01%) as a preservative. Store at 2-8 C when not in use.
- ImmunoCard Substrate I\*:** A buffered solution containing tetramethylbenzidine and peroxide. Store at 2-8 C when not in use.
- Plastic transfer pipettes with measuring marks for 25 µL and 150 µL.**

\* In a plastic dropper vial. Use as supplied.

### MATERIALS NOT PROVIDED

- Disposable latex gloves should be used during the handling of the fecal samples as they are considered potentially biologically hazardous material.
- Vortex for suspending of the stool sample in the Sample Diluent.
- Interval timer
- Wooden applicator sticks
- Small test tubes, such as 10 x 75 mm or 12 x 75 mm

### PRECAUTIONS

- All reagents are for in vitro diagnostic use.
- Do not store at temperatures above 2-8 C. Do not freeze.
- Do not deviate from the established insert method or falsely positive or falsely negative results may occur.
- Some patient samples contain infectious agents; therefore all patient samples should be handled and disposed of as if they are biologically hazardous.
- DO NOT interchange the Test Card, Enzyme Conjugate and Positive Control reagents from different kit lot numbers. The other reagents (Sample Diluent/Negative Control, 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.
- All stool samples must be mixed thoroughly before testing, regardless of consistency, to ensure a representative sample prior to testing.
- Failure to bring samples and reagents to room temperature (20-26 C) before testing may decrease assay sensitivity.
- 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.
- Do not use the Sample Diluent/Negative Control 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.
- 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.
- Hold reagent vials vertically when dispensing drops to ensure consistent drop size and delivery.

### WARNINGS

- Patient specimens may contain infectious agents and should be handled and disposed of as potential biohazards.
- Dispose of all used test materials in an appropriate container. Treat waste as a potential biohazard.

### HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

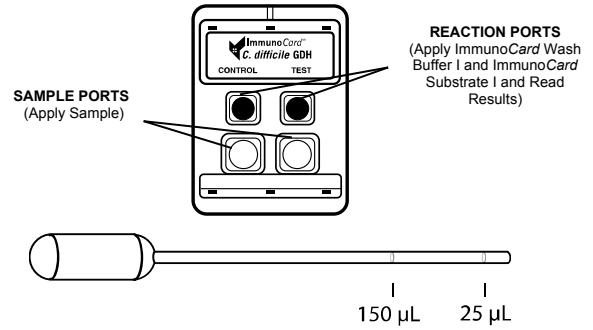
Refer to the SDS, available at [www.meridianbioscience.com](http://www.meridianbioscience.com) for Hazards and Precautionary Statements.

### SHELF LIFE AND STORAGE

The kit expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-8 C and return the kit promptly to the refrigerator after each use.

### PROCEDURAL NOTES

- The ImmunoCard test card and pipette are diagrammed below:



- 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.
- 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.

### REAGENT PREPARATION

Bring the entire kit, including test card pouch, to 20-26 C before use. No additional reagent preparation is required.

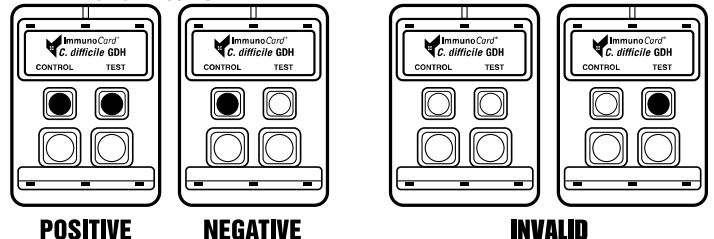
### SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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 five days at 2-8 C prior to testing. Samples that will not be tested within five days should be frozen immediately on receipt and stored frozen ( $\leq -20$  C) until tested. Sample may be held for up to 30 days and may be frozen and thawed twice.

### TEST PROCEDURE

- 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.
- Label 1 test tube for each patient sample to be tested.
- Add 200 µL of Sample Diluent/Negative Control to a test tube using the dropper in the bottle.
- Immediately add stool sample or control as follows:
  - 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. Use the same pipette to mix the stool by gently aspirating, then dispensing the suspension several times. Vortex the mixture for 10 seconds. Leave the pipette in the tube for use later in the test.\*
  - 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. 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 using in testing.\*
  - Optional control:** Using the container droppers, add 1 drop of Positive Control or Sample Diluent/Negative Control to the Diluent. Vortex for 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 completely may result in a false-negative test result. Addition of too much stool sample may cause invalid results due to restricted sample flow.
- Add 3 drops of ImmunoCard *C. difficile* GDH Enzyme Conjugate (150 µL) to each tube. Vortex the mixture for 10 seconds. Leave the pipette in the tube for use later in the test.
- Let each diluted sample stand for 15 minutes at 20-26 C.
- 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.
- Vortex each sample or control for 10 seconds before use.
- 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).
- Incubate for 5 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.
- Hold the ImmunoCard Wash Buffer I vial vertically and dispense exactly 3 drops to each of the reaction ports.
- When the ImmunoCard Wash Buffer I has completely absorbed, hold the vial vertically and add exactly 3 drops of ImmunoCard Substrate I reagent.
- Incubate the test card at 20-26 C for 5 minutes.
- 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 *C. difficile* GDH is 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* GDH is 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:

- 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 GDH may also present with a positive TEST yet negative CONTROL port.
- 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.

- At the time of each use, kit components should be visually examined for obvious signs of microbial contamination, freezing or leakage. Do not use contaminated or suspect reagents.
- The performance of each new kit lot or each new shipment of the ImmunoCard C. difficile GDH kit should be verified on receipt or before use. See the INTERPRETATION OF RESULTS section above for a description of the expected results for control reagents. Tests should be considered invalid when either control reagent does not produce the expected results. In such cases, repeat tests and controls. If, on repeat testing, the expected reactions are still not observed with in-date reagents, call Meridian's Technical Support Services at 800-343-3858 (USA) or your authorized Meridian distributor for assistance.
- The controls are used to monitor reagent reactivity. Failure of the controls to produce the expected results can mean that one or more of the reagents are no longer reactive at the time of use, the test was not performed correctly, or that reagents or samples were not added. 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.
- 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.
- Specimen matrix interference has not been observed in this assay as samples are significantly diluted before testing in Sample Diluent. For this reason, the Positive and Negative Controls supplied as part of this assay are prepared in matrices similar to the Sample Diluent. If control materials that are identical in composition to test samples are preferred, the user can prepare these by diluting known positive and negative specimens in Sample Diluent according to the SPECIMEN PREPARATION section of this insert.

### 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* infection in patients suspected of having antibiotic-associated diarrhea is 15-25%<sup>4</sup> although different facilities may find positivity rates outside this range. In clinical trials conducted for this assay, samples were collected from 975 male (45.7%) and female (54.3%) patients. Pediatric patients ranged from 14 days to 21 years. The prevalence in the populations in this clinical trial was 13.6%.

### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The test is qualitative and no quantitative interpretation should be made with respect to the intensity of the color when reporting the result.
- A positive result does not define the existence of *C. difficile* disease or the presence of toxigenic *C. difficile*, but only indicates the detection of the organism. All ImmunoCard C. difficile GDH positive stools should be tested by another method to verify the presence of toxigenic *C. difficile*.
- Staphylococcus aureus* (Cowan strain I) was found to be crossreactive with ImmunoCard C. difficile GDH.
- Samples containing whole blood at concentrations greater than 40% have the potential to produce false negative results.
- SHEA/IDSA Guideline defines the best strategy for *C. difficile* testing as testing performed only on diarrheal (unformed) stool, unless ileus due to *C. difficile* is expected. The proper specimen for the diagnosis of *C. difficile* infection is a watery, loose or unformed stool. Because 10% or more of hospitalized patients may be colonized with *C. difficile*, evaluating a formed stool can decrease the specificity of diagnosis of CDAD.<sup>5</sup>
- There is insufficient data to evaluate the performance of this device with specimens from patients 0-28 days old and 18-21 years old.

### SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

ImmunoCard C. difficile GDH was evaluated by five independent test sites located in the Western, Southwestern, Southeastern, and Midwestern regions of the United States. A total of 975 qualified patient samples were evaluated; all specimens were prospectively collected samples. Samples were collected from males (46%) and females (54%) and categorized as solid (17.1%), semi-solid (50.8%), bloody (0.5%) and watery (31.5%). The age groups of the patients ranged from 14 days to 111 years of age. No differences in test performance were observed based on patient age or gender. The following tables show the assay performance by clinical site and patient age.

Table 1. Performance characteristics by clinical site

Site	Positive Samples			Negative Samples		
	ImmunoCard C. difficile GDH/Culture	Sensitivity %	95% CI	ImmunoCard C. difficile GDH/Culture	Specificity % <sup>1</sup>	95% CI
Total Sites	124/127	97.6% <sup>1</sup>	93.3 – 99.2%	738/848	87.0% <sup>2</sup>	84.6 – 90.1%
Site 1	32/32	100.0%	89.3 - 100.0%	165/205	80.5%	74.5 – 85.3%
Site 2	39/41	95.1%	83.9 – 98.7%	257/290	88.6%	84.4 – 91.8%
Site 3	35/36	97.2%	85.8 – 99.5%	140/168	83.3%	77.0 – 88.2%
Site 4	8/8	100.0%	67.6 – 100.0%	76/80	95.0%	87.8 – 98.0%
Site 5	10/10	100.0%	72.2 – 100.0%	100/105	95.2%	89.3 – 97.9%

<sup>1</sup> Three of 3 false negatives tested negative by another FDA cleared GDH assay.

<sup>2</sup> Seventy-four of the 110 false positives tested positive by another FDA cleared GDH assay.

<sup>3</sup> Refer to Table 2 footnote.

Table 2. Performance characteristics by patient age

Patient Age	Positive Samples			Negative Samples		
	ImmunoCard C. difficile GDH/Culture	Sensitivity %	95% CI	ImmunoCard C. difficile GDH/Culture	Specificity % <sup>1</sup>	95% CI
0-28 days	0/0	N/A	N/A	1/1	100.0%	20.7 – 100.0%
29 days to 2 years	22/22	100.0%	85.1 - 100.0%	72/98	73.5%	64.0 - 81.2%
> 2 years to < 12 years	30/30	100.0%	88.6 - 100.0%	130/160	81.3%	74.5 - 86.5%
12 years to < 18 years	14/15	93.3%	70.2 - 98.8%	80/88	90.9%	83.1 - 95.3%
18 years to 21 years	5/5	100.0%	56.6 - 100.0%	25/29	86.2%	69.4 - 94.5%
> 21 years	53/55	96.4%	87.7 - 99.0%	430/472	91.1%	88.2 - 93.3%

The ImmunoCard C. difficile GDH assay was designed to be a highly sensitive tier-one test with a Negative Predictive Value (NPV) close to 100% to increase the likelihood that the assay would identify most potentially positive samples. Because of the assay design, it is expected that the lower bounds of the confidence intervals could be below 90%. The ImmunoCard C. difficile GDH assay has a NPV of 99.6% (CI = 98.8 - 99.9%), which demonstrates that the assay is sufficiently sensitive to identify most potentially positive samples, therefore increasing the likelihood that all toxigenic samples would be identified by the subsequent testing.

### ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity of the ImmunoCard C. difficile GDH test is 10 ng/mL in stool and 1.0 ng/mL when diluted in a non-matrix system.

### REPRODUCIBILITY

Assay precision, intra-assay variability and inter-assay variability were assessed with a reference panel prepared from pools of negative samples spiked with *C. difficile* GDH antigen. The reproducibility panel consisted moderately positive (n=3), low positive (n=3), high negative (n=3), and negative (n=1) specimens. The low positive and high negative specimens were prepared near the assay limit of detection. Each sample was evaluated twice per day for five days by three different laboratories. Reproducibility was 99.7% with no intra-assay and inter-assay variability for samples prepared above or below the limit of detection for the assay.

### CROSSREACTIVITY

Crossreactivity studies were performed with positive and negative stool specimens inoculated with bacterial or fungal organisms to a final concentration of 1.2 x 10<sup>8</sup> CFU/mL or virus concentration greater than 1 x 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL. None of the following organisms in stool reacted with ImmunoCard C. difficile GDH:

*Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Group B, *Salmonella* Group C, *Salmonella* Group D, *Salmonella* Group E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Type 40, Adenovirus Type 41, Coxsackievirus Strain B4, Echovirus Strain 30, Rotavirus Strain WA.

Stools spiked with *Staphylococcus aureus* (Cowan strain I) were found to be crossreactive with ImmunoCard C. difficile GDH.

### ASSAY SPECIFICITY

The following *C. difficile* stock cultures from different sources were tested and produced positive reactions at a concentration of 1.2 x 10<sup>7</sup> CFU/mL with the ImmunoCard C. difficile GDH assay:

Toxigenic *C. difficile* strains: 8864, 10463, 43598, 2004052, 2004111, 2004118, 2004205, 2004206, 2005070, 2005257, 2005325, 2006240, 2007431, 2007435, 2007858, 2008016, 2008029, 2008162, 2008188, 2008341, 2008351, 2009018, 2009065, 2009066, 2009099, 2009132, 2009155, 2009277, B1, B17, B18, BK6, CF1, G1, J7, K12, Y1

Non-toxigenic *C. difficile* strains: 11186, 234, 586, 611, 620, 2C62, 2C165, 1C272, UNC19904, X15076

### TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

The following substances, at the specified saturated solvent/diluent concentrations, do not interfere with test results in the final concentrations listed:

Barium sulfate (5 mg/mL), Fecal fat (2.65 mg stearic acid and 1.3 mg palmitic acid/mL), Hemoglobin (3.2 mg/mL), Iodium AD<sup>®</sup> (Loperamide HCl) (6.67 x 10<sup>-3</sup> mg/mL), Kaopectate<sup>®</sup> (Bismuth subsalicylate) (0.87 mg/mL), Metronidazole (12.5 mg/mL), Mucin (3.33 mg/mL), Mylanta<sup>®</sup> (Aluminum hydroxide w/ magnesium hydroxide) (4.2 mg/mL), Pepto-Bismol<sup>®</sup> (Bismuth subsalicylate) (0.87 mg/mL), Polyethylene glycol (79.05 mg/mL), Prilosec<sup>®</sup> (Omeprazole) (0.5 mg/mL), Simethicone (0.625 mg/mL), Tagamet<sup>®</sup> (Cimetidine) (0.5 mg/mL), Tums<sup>®</sup> (Calcium carbonate) (5.0 mg/mL), Vancomycin HCl (2.5 mg/mL), Whole blood (40%), White blood cells (5%).

Samples containing whole blood at concentrations greater than 40% have the potential to produce false negative results.

### ITALIANO



Test immunoenzimatico rapido per il rilevamento di antigeni di *Clostridium difficile* in campioni fecali

REF 716050

IVD

Rx Only

### FINALITÀ D'USO

ImmunoCard C. difficile GDH è un test di screening, qualitativo, immunoenzimatico rapido, per la rilevazione dell'antigene di *Clostridium difficile*, la glutammato deidrogenasi, in campioni fecali di pazienti con sospetta infezione da *C. difficile* (CDI). Il test non distingue tra ceppi tossigenici e non tossigenici di *C. difficile*. Al fine di giungere ad una diagnosi di CDI, i campioni di pazienti che producono risultati positivi con questo test devono essere ulteriormente analizzati con un test specifico per il rilevamento dei ceppi tossigenici di *C. difficile*.

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il *Clostridium difficile* è noto in tutto il mondo come il più importante agente eziologico della diarrea nosocomiale. L'infezione da *C. difficile* (CDI) può manifestarsi come diarrea lieve fino a raggiungere sintomatologie molto più gravi, come il megacolon tossico potenzialmente letale. I tipici fattori di rischio per la CDI nosocomiale includono l'assunzione di antibiotici e l'età avanzata. Tuttavia di recente la CDI si è manifestata più frequentemente in ambienti esterni a quelli ospedalieri, senza i tipici fattori di rischio storicamente associati all'infezione da *C. difficile*.<sup>1</sup> Tutti i ceppi di *C. difficile* producono glutammato deidrogenasi (GDH), nota anche come antigene comune.<sup>2,3</sup> Alcuni ceppi di *C. difficile* producono due tossine (tossina A e tossina B), entrambe associate alla malattia. I ceppi di *C. difficile* che non sono portatori dei geni della tossina A e della tossina B sono considerati non patogeni. Gli esami di laboratorio non molecolari per la rilevazione di *C. difficile* si suddividono in due gruppi principali: metodica basata sulle tossine e metodica non basata sulle tossine. I test basati sulle tossine comprendono test immunoenzimatici (EIA) per la tossina A o le tossine A e B e i test di citotossicità, che rileva principalmente la tossina B. I test non basati sulle tossine, quali i test EIA per il GDH di *C. difficile*, benché più sensibili, devono essere seguiti da test per la rilevazione *C. difficile* tossigenico.

### PRINCIPI BIOLOGICI

ImmunoCard C. difficile GDH è costituito da una membrana montata su un supporto di plastica con due pozzetti per il campione e due pozzetti di reazione. La membrana contiene anticorpi immobilizzati specifici per la glutammato deidrogenasi. Il Coniugato Enzimatico consiste di anticorpi per la glutammato deidrogenasi accoppiati alla perossidasi di rafano. Per eseguire il test, il campione fecale del paziente viene diluito con il diluente e il Coniugato Enzimatico, quindi la miscela viene lasciata incubare per 15 minuti. Durante l'incubazione l'antigene GDH, se presente, si lega agli anticorpi anti-GDH del coniugato. Dopo l'incubazione, un'aliquota della miscela viene aggiunta a ciascuno dei due pozzetti per il campione e il test viene lasciato incubare per altri cinque minuti a 20-26°C. Durante la seconda incubazione, il complesso GDH-coniugato si separa dalla materia solida mentre la parte fluida scorre attraverso la membrana verso i pozzetti di reazione TEST e CONTROL. I complessi GDH-coniugato vengono quindi catturati nella porta di reazione TEST dagli anticorpi immobilizzati sulla membrana di reazione. (Il secondo dei due pozzetti di reazione funge da controllo interno). Prima di aggiungere il Substrato, entrambi i pozzetti di reazione vengono lavati con la Soluzione di lavaggio per ridurre l'interferenza di proteine contaminanti. I pozzetti di reazione vengono lasciati incubare per altri cinque minuti, mentre il Coniugato enzimatico modifica il Substrato. Il risultato è indicato dalla comparsa del colore blu. I risultati vanno interpretati visivamente. La comparsa del colore blu nel pozzetto di reazione TEST indica un risultato positivo. Nel pozzetto CONTROL, gli anticorpi anti-GDH del coniugato si legano direttamente agli anticorpi immobilizzati. La comparsa del colore blu nel pozzetto di reazione CONTROL indica che il campione è stato aggiunto, i reagenti erano attivi al momento dell'uso e il campione è migrato correttamente.

### REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

- ImmunoCard C. difficile GDH, dispositivo test (Card di Analisi): una membrana alloggiata in un supporto di plastica e sigillata in una busta di alluminio con essiccante. La membrana contiene anticorpi policlonali anti-GDH immobilizzati nel pozzetto di reazione TEST e anticorpi di capra anti-topo nel pozzetto di reazione CONTROL. Quando non vengono usate, conservare le card a una temperatura compresa fra 2 e 8°C.

- Controllo Positivo\***: *C. difficile* GDH in una soluzione proteica tamponata contenente ProClin® (0,1%) e gentamicina (0,03%) come conservanti. Quando non viene usato, conservare il prodotto a una temperatura compresa fra 2 e 8 C.
- Diluente del Campione/Controllo Negativo\***: soluzione proteica tamponata contenente gentamicina (0,03%) e thimerosal (0,02%) come conservanti. Quando non viene usato, conservare il prodotto a una temperatura compresa fra 2 e 8 C.
- Coniugato Enzimatico\***: anticorpo monoclonale anti-GDH coniugato con perossidasi di rafano e sospeso in una soluzione proteica tamponata contenente gentamicina e thimerosal (0,02%). Quando non viene usato, conservare il prodotto a una temperatura compresa fra 2 e 8 C.
- ImmunoCard Soluzione di Lavaggio I\***: una soluzione tamponata contenente thimerosal (0,01%) come conservante. Quando non viene usato, conservare il prodotto a una temperatura compresa fra 2 e 8 C.
- ImmunoCard Substrato I\***: una soluzione tamponata contenente tetrametilbenzidina e perossido. Quando non viene usato, conservare il prodotto a una temperatura compresa fra 2 e 8 C.
- Pipette di trasferimento in plastica con tacche di misurazione per 25 µL e 150 µL.**

\* In flacone contagocce di plastica. Usare il prodotto come fornito.

#### MATERIALI NON FORNITI

- Guanti di lattice monouso da usare per la manipolazione dei campioni fecali, che vanno considerati sostanze biologicamente pericolose.
- Vortex per la sospensione del campione fecale nel Diluente del campione.
- Timer
- Applicatori in legno a bastoncino
- Provette piccole per le analisi (ad esempio, 10 x 75 mm o 12 x 75 mm)

#### PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- Non conservare a temperature superiori a 2-8 C. Non congelare.
- Non deviare dal metodo prestabilito di dispensazione dei reagenti, in caso contrario potrebbero verificarsi risultati falso positivi o falso negativi.
- I campioni dei pazienti possono contenere altri agenti infettivi, pertanto tutti i campioni vanno maneggiati e smaltiti come sostanze biologicamente pericolose.
- NON scambiare le Card di Analisi, il Coniugato Enzimatico e i reagenti di Controllo Positivo provenienti da kit con numeri di lotto diversi. Gli altri reagenti (Diluente del campione/Controllo Negativo, ImmunoCard Soluzione di lavaggio I, ImmunoCard Substrato I) possono essere scambiati, purché usati entro la data di scadenza. Non usare i reagenti oltre la data di scadenza.
- Tutti i campioni fecali vanno miscelati a fondo prima delle analisi, a prescindere dalla consistenza, al fine di ottenere un campione adeguatamente rappresentativo.
- Se non si portano campioni e reagenti a temperatura ambiente (20-26 C) prima di dare inizio alle analisi, la sensibilità del test potrebbe diminuire.
- Controllare attentamente le Card di analisi prima di estrarle dalle buste di alluminio. Non usare le Card di analisi se le buste di alluminio presentano fori o non sono state completamente sigillate. Non usare le Card se l'indicatore dell'essiccante ha cambiato colore, da blue a rosa. Il deterioramento dovuto a una conservazione inadeguata delle Card di analisi potrebbe produrre risultati falso negativi.
- Non usare il Diluente per campioni/Controllo Negativo o il Controllo Positivo se appaiono scoloriti o torbidi, in quanto ciò potrebbe indicare la presenza di una contaminazione microbica. È normale che la ImmunoCard Soluzione di Lavaggio I di appaia leggermente torbida.
- Il ImmunoCard Substrato I è sensibile alla luce e va conservato al buio. Il reagente deve apparire limpido e incolore, non utilizzarlo se dovesse presentare un colore qualsiasi o essere torbido.
- Durante l'erogazione delle gocce, i flaconi dei reagenti vanno mantenuti in posizione verticale al fine di assicurarne portata e dosaggio costanti.

#### AVVERTENZE

- I campioni dei pazienti possono contenere agenti infettivi, pertanto vanno maneggiati ed eliminati come materiale biologicamente pericoloso.
- Eliminare in un apposito contenitore tutti i materiali usati per il test. Tutto il materiale di scarto va considerato come materiale potenzialmente pericoloso.

#### DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

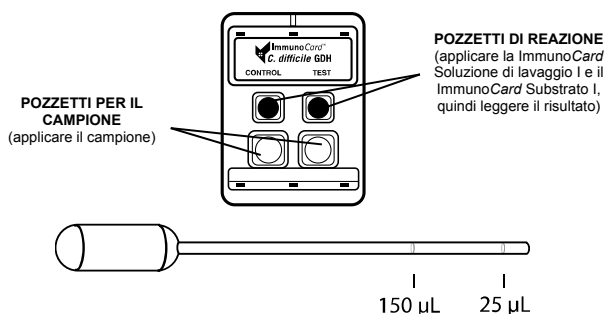
Fare riferimento alla SDS, disponibile sul sito [www.meridianbioscience.com](http://www.meridianbioscience.com) (US version) / [www.meridianbioscience.eu](http://www.meridianbioscience.eu) (EU version) per i rischi e i consigli di prudenza.

#### STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta dello stesso. Conservare il kit a 2-8 C e riportarlo nel frigorifero immediatamente dopo l'uso.

#### NOTE PROCEDURALI

- Il diagramma seguente mostra la Card di Analisi ImmunoCard e la pipetta:



- È possibile analizzare una serie di campioni o controlli alla volta purché si seguano, per ciascuna Card di Analisi, le fasi corrette, l'ordine di aggiunta dei reagenti e gli intervalli di incubazione e di lettura dei risultati. Prima di procedere alla fase successiva, completare ognuna delle fasi procedurali per ciascun campione.
- Il lato Control (a sinistra) di ciascuna Card di Analisi fornisce un controllo interno per ciascun campione, allo scopo di verificare la corretta diluizione del campione stesso e il funzionamento dei reagenti.

#### PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare l'intero kit, inclusa la busta della Card di Analisi, a temperatura ambiente (20-26 C) prima dell'uso. Tutti i reagenti sono pronti all'uso.

#### RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni fecali devono essere trasportati in un contenitore ermetico e conservati a 2-8 C prima delle analisi. I campioni devono essere analizzati non appena possibile, ma possono essere conservati fino a 5 giorni ad una temperatura compresa tra 2 e -8 C prima delle analisi. Qualora non sia possibile eseguire le analisi entro questo intervallo di tempo, congelare immediatamente i campioni e conservarli congelati ( $\leq -20$  C) fino all'esecuzione del test. Il campione può essere così conservato fino a 30 giorni e congelato/scongelato 2 volte.

#### PROCEDURA DEL TEST

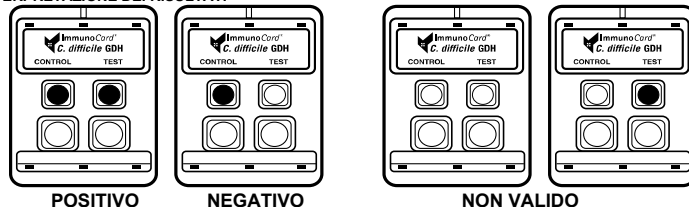
- Prima di dare inizio al test, portare le card di analisi, i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (20-26 C). Togliere i reagenti dalla scatola del kit per lasciarli riscaldare. I reagenti potrebbero richiedere fino a 60 minuti per riscaldarsi dopo la refrigerazione. **REPORTARE A 2-8 C IMMEDIATAMENTE DOPO L'USO.**
- Etichettare 1 provetta per ciascun campione da analizzare.
- Con il contagocce del flacone, aggiungere 200 µL di Diluente del campione/Controllo Negativo ad una provetta.

- Aggiungere immediatamente il campione fecale o il reagente di controllo nel modo seguente:
  - Feci liquide/semi solide** – Miscelare bene il campione fecale. Usando una pipetta di trasferimento pulita (fornita con il kit), aspirare il campione fino alla prima tacca dalla punta della pipetta (25 µL). Dispensare il campione nel Diluente. Usare la stessa pipetta per miscelare il campione aspirando delicatamente, quindi dispensando la sospensione alcune volte. Agitare la miscela con il vortex per 10 secondi. Lasciare la pipetta nella provetta per un utilizzo successivo nel corso dell'analisi.\*
  - Feci formate/solide** – Miscelare bene il campione fecale. Usando un bastoncino di legno, trasferire una piccola porzione (di circa 2 mm di diametro) di feci nella provetta con il Diluente. 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.\*
  - Controllo facoltativo:** Usando i contagocce dei facconi, aggiungere alla provetta con il Diluente 1 goccia di Controllo Positivo o di Diluente del campione/Controllo Negativo. Agitare con il vortex per 10 secondi. Aggiungere una pipetta nella provetta e lasciarla per un utilizzo successivo nel corso dell'analisi.

\*NOTA: il trasferimento di un campione insufficiente o la mancata miscelazione e sospensione del campione nel Diluente potrebbe produrre risultati falso negativi. L'aggiunta di una quantità eccessiva di campione potrebbe produrre risultati non validi a causa di un inadeguato flusso nel dispositivo.

- Aggiungere 3 gocce di Coniugato Enzimatico (150 µL) in ciascuna provetta. Agitare la miscela con il vortex per 10 secondi. Lasciare la pipetta nella provetta per un utilizzo successivo nel corso dell'analisi.
- Lasciare riposare ciascun campione diluito per 15 minuti a 20-26 C.
- Usare 1 Card di Analisi ImmunoCard per ciascun campione o controllo. Quando si è pronti a eseguire l'analisi, estrarre la Card di Analisi ImmunoCard dalla busta di alluminio. Gettare via la busta e l'essiccante. Etichettare il dispositivo con il nome del paziente o del controllo corrispondente.
- Agitare con il vortex ciascun campione o controllo per 10 secondi prima dell'uso.
- Aggiungere 150 µL di campione diluito o di controllo diluito in ciascuno dei due pozzetti del campione di una singola Card di Analisi (150 µL corrispondono alla seconda tacca sulla pipetta di trasferimento).
- Lasciare incubare a 20-26 C per 5 minuti.
- NOTA: al termine dell'incubazione, entrambi i pozzetti di reazione devono apparire completamente bagnati. Se uno dei due pozzetti di reazione non è completamente bagnato, gettare via la Card di Analisi e ripetere la procedura. Eseguire l'analisi se il campione non viene assorbito ma i pozzetti appaiono completamente umidi.**
- Mantenere il flacone della ImmunoCard Soluzione di Lavaggio I in posizione verticale ed erogare esattamente 3 gocce in ciascuno dei pozzetti di reazione.
- Dopo che la ImmunoCard Soluzione di Lavaggio I è stata completamente assorbita, aggiungere esattamente 3 gocce di ImmunoCard Substrato I tenendo il flacone in posizione verticale.
- Incubare la Card di Analisi per 5 minuti a 20-26 C.
- Leggere visivamente i risultati di ciascuna Card entro 30 secondi dal termine dell'incubazione.**

#### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI



#### LEGGERE SOLO I POZZETTI DI REAZIONE SUPERIORI PER INTERPRETARE I RISULTATI

**NOTA: ignorare qualsiasi comparsa di colore nei pozzetti del campione. Il colore nei pozzetti del campione non deve in alcun modo essere preso in considerazione nel corso del test.**

**Risultato positivo:** presenza di colore blu nei pozzetti di reazione TEST (in alto a destra) e CONTROL (in alto a sinistra). L'intensità del colore blu nella parte inferiore del pozzetto TEST può variare rispetto alla parte superiore dello stesso pozzetto. Un risultato positivo indica la presenza di *C. difficile* GDH nel campione. **NOTA:** il pozzetto TEST potrebbe presentare un colore blu meno intenso rispetto al pozzetto CONTROL.

**Risultato negativo:** presenza di colore blu solamente nel pozzetto di reazione CONTROL (in alto a sinistra). Il pozzetto di reazione TEST (in alto a destra) deve essere incolore. (L'umidità della membrana può far apparire il pozzetto TEST leggermente grigio). Un risultato negativo indica che *C. difficile* GDH è assente o è presente ad un livello inferiore rispetto al limite di rilevazione del test. Occasionalmente il POZZETTO TEST (in alto a destra) potrebbe presentare una lieve traccia colorazione blu nel lato sinistro o nel lato destro del pozzetto stesso, mentre il resto del pozzetto rimane incolore. In questo caso il risultato deve essere considerato negativo.

#### Risultati non validi:

- Il colore blu non è visibile nel pozzetto di reazione CONTROL. Il mancato funzionamento del pozzetto CONTROL rende l'analisi non valida. Ciò può essere dovuto alla scarsa resa di un reagente o a un malfunzionamento della Card di analisi, alla mancata aggiunta o migrazione del campione, o alla incorretta diluizione del campione con conseguente eccessiva inoculazione della Card di analisi. I campioni con livelli di GDH estremamente elevati possono anche produrre un pozzetto TEST positivo nonostante il pozzetto CONTROL risulti negativo.
- Presenza di un anello blu nel supporto di plastica attorno al pozzetto TEST (in alto a destra) durante la procedura di analisi. Quando si ottengono risultati non validi, è necessario diluire nuovamente il campione e ripetere l'analisi con una card nuova.

#### CONTROLLO QUALITÀ

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

- Ad ogni utilizzo, esaminare visivamente i componenti del kit per controllare che non vi siano segni di contaminazione microbica, congelamento o perdite. Non usare reagenti contaminati o sospetti.
- Le prestazioni di ogni nuovo lotto o di ogni nuova spedizione del Kit ImmunoCard GDH dovrebbero essere verificate alla ricezione o prima dell'uso. Vedere la sezione INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI sopra indicata per la descrizione dei risultati attesi con i reagenti di controllo. Le analisi vanno considerate non valide quando anche solo uno dei due reagenti di controllo non produce i risultati attesi. In questi casi, è necessario ripetere le analisi e i controlli. Se, dopo aver ripetuto le analisi, non si ottengono ancora i risultati attesi usando reagenti entro la data di scadenza, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian o il Distributore Locale.
- I controlli servono a monitorare la reattività dei reagenti. Risultati inattesi possono indicare che uno o più reagenti non sono più reattivi al momento dell'uso, che l'analisi non è stata eseguita correttamente, oppure che i reagenti o i campioni non sono stati aggiunti. **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, (Italia +390331433636).**
- Ciascuna Card di analisi contiene un controllo interno. La presenza del colore blu nel pozzetto di reazione CONTROL conferma che il test era correttamente funzionante al momento dell'uso e che il campione è stato aggiunto ed è migrato correttamente.
- In questo test non è stata osservata l'interferenza della matrice dei campioni, in quanto i campioni vengono notevolmente diluiti prima dell'analisi. Per questo motivo i reagenti di Controllo Positivo e Negativo prodotti per questo test sono preparati in matrici simili a quella del Diluente del campione. Se per le analisi dei campioni si preferisce usare materiali di controllo di composizione identica a quella dei campioni stessi, l'utente può prepararli diluendo i campioni noti positivi e negativi nel Diluente secondo le istruzioni indicate nella sezione PREPARAZIONE DEI CAMPIONI di questo inserto.

#### VALORI ATTESI

La frequenza di diarrea da antibiotico causata da *C. difficile* dipende da diversi fattori, inclusi: la composizione della popolazione di pazienti, il tipo di istituto e l'epidemiologia. L'incidenza di infezione da *C. difficile* riportata in pazienti in cui si sospetta diarrea da antibiotico è del 15-25%, benché in differenti strutture si possano riscontrare tassi di positività al di fuori di questo intervallo. Nelle sperimentazioni cliniche condotte per questo test, i campioni sono stati raccolti da 975 pazienti, maschi (45,7%) e femmine (54,3%). Lo studio ha incluso pazienti pediatrici dai 14 giorni a 21 anni. La prevalenza nelle popolazioni in questo studio clinico è stata del 13,6%.

## LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Il test è qualitativo, pertanto non si devono formulare interpretazioni quantitative dei valori ottenuti in base all'intensità del colore.
- Un risultato positivo non implica la presenza di infezione da *C. difficile* o la presenza di *C. difficile* tossigenico, ma indica semplicemente il rilevamento dell'organismo. Tutti i campioni fecali che producono risultati positivi con ImmunoCard C. difficile GDH devono essere analizzati con un altro metodo al fine di verificare la presenza di *C. difficile* tossigenico.
- ImmunoCard C. difficile GDH cross reagisce con *Staphylococcus aureus* (ceppo Cowan I).
- Campioni contenenti sangue intero in concentrazioni superiori al 40% possono potenzialmente dare origine a risultati falso-negativi.
- Le Linee Guida SHEA/IDSA indicano quale migliore strategia per la ricerca di *C. difficile* l'analisi delle sole feci diarroiche (feci non formate) a meno che si sospetti un blocco intestinale causato da *C. difficile*. Il campione idoneo per la diagnosi di infezione da *C. difficile* è il campione acquoso, liquido o non formato. Poiché più del 10% dei pazienti ospedalizzati possono essere colonizzati da *C. difficile*, l'analisi di feci formate può determinare una diminuzione di specificità nella diagnosi della malattia da *C. difficile*.<sup>5</sup>
- Non sono disponibili ad oggi dati sufficienti per valutare le prestazioni di questo test su campioni provenienti da pazienti di età compresa tra 0-28 giorni e tra 18 e 21 anni.

## PRESTAZIONI SPECIFICHE

ImmunoCard C. difficile GDH è stato valutato in cinque siti prova indipendenti situati nelle regioni Ovest, Sudovest, Sudest e Centro est degli Stati Uniti. Sono stati valutati un totale di 975 campioni qualificati; tutti i campioni sono stati raccolti in modo prospettico. Il campione provenivano da uomini (46%), donne (54%), e sono state classificate come feci solide (17,1%), semisolide (50,8%), sanguinolente (0,5%) ed acquose (31,5%). L'età dei pazienti era compresa tra 14 giorni a 111 anni. Non sono state rilevate differenze nelle prestazioni del test in base all'età o al sesso dei pazienti. Le tabelle di seguito riportate riassumono i risultati, raggruppati per sito di valutazione ed età del paziente.

Tabella 1. Prestazioni Caratteristiche per sito clinico

Sito	Campioni Positivi			Campioni Negativi		
	ImmunoCard C. difficile GDH/Coltura	Sensibilità %	95% CI	ImmunoCard C. difficile GDH/Coltura	Specificità % <sup>3</sup>	95% CI
<b>totale</b>	<b>124/127</b>	<b>97,6%<sup>1</sup></b>	<b>93,3 – 99,2%</b>	<b>738/848</b>	<b>87,0%<sup>2</sup></b>	<b>84,6 – 90,1%</b>
Sito 1	32/32	100,0%	89,3 – 100,0%	165/205	80,5%	74,5 – 85,3%
Sito 2	39/41	95,1%	83,9 – 98,7%	257/290	88,6%	84,4 – 91,8%
Sito 3	35/36	97,2%	85,8 – 99,5%	140/168	83,3%	77,0 – 88,2%
Sito 4	8/8	100,0%	67,6 – 100,0%	76/80	95,0%	87,8 – 98,0%
Sito 5	10/10	100,0%	72,2 – 100,0%	100/105	95,2%	89,3 – 97,9%

<sup>1</sup> Tre dei 3 campioni falsi negativi sono risultati negativi anche con altro test GDH approvato FDA.

<sup>2</sup> Sessantatré dei 110 campioni falsi positivi sono risultati positivi con altro test GDH approvato FDA.

<sup>3</sup> Fare riferimento alla nota nella tabella 2.

Tabella 2. Prestazioni Caratteristiche per età del paziente

Età del paziente	Campioni Positivi			Campioni Negativi		
	ImmunoCard C. difficile GDH/Coltura	Sensibilità %	95% CI	ImmunoCard C. difficile GDH/Coltura	Specificità % <sup>1</sup>	95% CI
0-28 giorni	0/0	N/A	N/A	1/1	100,0%	20,7 – 100,0%
Da 29 giorni a 2 anni	22/22	100,0%	85,1 – 100,0%	72/98	73,5%	64,0 – 81,2%
Da > 2 anni a < 12 years	30/30	100,0%	88,6 – 100,0%	130/160	81,3%	74,5 – 86,5%
Da 12 anni a < 18 anni	14/15	93,3%	70,2 – 98,8%	80/88	90,9%	83,1 – 95,3%
Da 18 anni a 21 anni	5/5	100,0%	56,6 – 100,0%	25/29	86,2%	69,4 – 94,5%
> 21 anni	53/55	96,4%	87,7 – 99,0%	430/472	91,1%	88,2 – 93,3%

<sup>1</sup> Il test ImmunoCard C. difficile GDH è stato progettato per essere un saggio di primo livello altamente sensibile e con un valore predittivo negativo (NPV) vicino al 100% al fine di aumentare la probabilità che il test identifichi più campioni potenzialmente positivi. A causa della progettazione del test, si prevede che il limite inferiore degli intervalli di confidenza possa essere inferiore al 90%. Il ImmunoCard C. difficile GDH ha un NPV del 99,6% (ic = 98,8-99,9%), il che dimostra che il saggio è sufficientemente sensibile per identificare la maggior parte dei campioni potenzialmente positivi, aumentando così la probabilità che tutti i campioni tossigenici possano essere identificati dai test successivi.

## SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica di ImmunoCard C. difficile GDH è di 10 ng/mL quando l'antigene viene dosato in campione di feci e di 1,0 ng/mL quando l'antigene è diluito in un diluente non matrice.

## RIPRODUCIBILITÀ

La precisione del saggio, la variabilità intra-saggio ed inter-saggio sono state determinate con un pannello di riferimento preparato con un pool di campioni negativi inoculati con antigene GDH di *C. difficile*. Il pannello per la riproducibilità consisteva in campioni moderatamente positivi (3), basso positivi (3), alto negativi (3) e negativi (1). I campioni basso positivi ed alto negativi sono stati preparati vicino al limite di rilevazione del test. Ogni campione è stato valutato due volte al giorno per cinque giorni da tre differenti laboratori. La riproducibilità è risultata essere del 99,7% senza alcuna variabilità intrasaggio ed intersaggio per i campioni preparati sopra o sotto il limite di rilevazione del test.

## CROSS-REATTIVITÀ

Gli studi di crossreattività sono stati condotti con campioni di feci positivi e negativi inoculati con batteri o funghi alla concentrazione finale di 1,2 x 10<sup>8</sup> CFU/mL o virus a concentrazione superiore 1 x 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL. Nessuno degli organismi elencati di seguito ha reagito con ImmunoCard C. difficile GDH.

*Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium bifementans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Group B, *Salmonella* Group C, *Salmonella* Group D, *Salmonella* Group E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Type 40, Adenovirus Type 41, Coxsackievirus Strain B4, Echovirus Strain 30, Rotavirus Strain WA.

Le feci inoculate con il ceppo Cowan I di *Staphylococcus aureus* hanno crossreatto positivamente con ImmunoCard C. difficile GDH.

## SPECIFICITÀ DEL TEST

Le seguenti colture stock di *C. difficile* con provenienze differenti sono state analizzate con ImmunoCard C. difficile GDH e hanno dato origine a risultati positivi alla concentrazione di 1,2 x 10<sup>7</sup> CFU/mL:

Cepi tossigenici di *C. difficile*: 8864, 10463, 43598, 2004052, 2004111, 2004118, 2004205, 2004206, 2005070, 2005257, 2005325, 2006240, 2007431, 2007435, 2007858, 2008016, 2008029, 2008162, 2008188, 2008341, 2008351, 2009018, 2009065, 2009066, 2009099, 2009132, 2009155, 2009277, B1, B117, B18, BK6, CF1, G1, J7, K12, Y1

Cepi non tossigenici di *C. difficile*: 11186, 234, 586, 611, 620, 2C62, 2C165, C122, UNC19904, X15076

## ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

Le seguenti sostanze non interferiscono con il test alla concentrazione finale riportata di seguito:

Barium sulfato (5 mg/mL), Grasso Fecale (2,65 mg stearic acid and 1,3 mg palmitic acid/mL), Hemoglobin (3,2 mg/mL), Imodium AD® (Loperamide HCl) (6,67 x 10<sup>3</sup> mg/mL), Kaopectate® (Bismuth subsalicylate) (0,87 mg/mL), Metronidazole (12,5 mg/mL), Mucin (3,33 mg/mL), Mylanta® (Aluminum hydroxide w/ magnesium hydroxide) (4,2 mg/mL), Pepto-Bismol® (Bismuth subsalicylate) (0,87 mg/mL), Polyethylene glycol (79,05 mg/mL), Prilosec® (Omeprazole) (0,5 mg/mL), Simethicone (0,625 mg/mL), Tagamet® (Cimetidine) (0,5 mg/mL), Tums® (Calcium carbonate) (5,0 mg/mL), Vancomycin HCl (2,5 mg/mL), Sangue Intero (40%), Globuli Bianchi (5%).

Campioni contenenti sangue intero a concentrazioni superiori al 40% possono potenzialmente dare origine a Risultati falso-negativi

## FRANÇAIS



Test immunoenzymatique rapide pour la détection des antigènes *Clostridium difficile* dans les selles

REF 716050

IVD

Rx Only

## BUT DE LA METHODE

ImmunoCard C. difficile GDH est un test de dépistage immuno-enzymatique rapide qualitatif permettant de détecter l'antigène de *Clostridium difficile*, la glutamate déshydrogénase, dans les spécimens fécaux de personnes présumées être porteuses de l'infection au *C. difficile* (ICD). Ce test ne différencie pas les souches toxigènes des souches non toxigènes de *C. difficile*. Les échantillons provenant de patients qui produisent des résultats positifs avec ce test doivent faire l'objet d'autres tests approfondis par le biais d'un test destiné à détecter les souches toxigènes de *C. difficile* et à contribuer au diagnostic de l'ICD.

## RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le *Clostridium difficile* est devenu l'agent étiologique le plus important de la diarrhée nosocomiale dans le monde. L'infection à *C. difficile* (ICD) peut aller d'une diarrhée légère à un mégacolon toxique mettant la vie en danger. Les facteurs de risque classiques de l'ICD nosocomial comprennent l'usage des antibiotiques et la vieillesse. Récemment, l'ICD a toutefois été constatée plus souvent à l'extérieur du milieu hospitalier sans les facteurs de risque typiques historiquement associés à l'infection à *C. difficile*.<sup>1</sup> Toutes les souches de *C. difficile* produisent de la glutamate déshydrogénase (GDH), également connue comme étant un antigène commun.<sup>2,3</sup> Certaines souches de *C. difficile* produisent deux toxines (la toxine A et la toxine B) qui sont toutes deux associées à la maladie. Les souches de *C. difficile* qui ne contiennent pas les gènes de la toxine A et de la toxine B sont considérées comme étant non pathogènes. Les tests de laboratoire non moléculaires pour la détection de *C. difficile* peuvent se diviser en deux groupes principaux: avec détection de toxines et sans détection de toxines. Les méthodes faisant intervenir la détection de toxines comprennent le test immunoenzymatique (EIA) pour la toxine A ou les toxines A et B et le test de cytotoxicité qui détecte principalement la toxine B. Les méthodes ne faisant pas intervenir la détection de toxines, tels que l'EIA pour la GDH C. difficile, quoique intrinsèquement plus sensibles, doivent être suivis d'une méthode de détection de *C. difficile* toxigène.

## PRINCIPE DU TEST

L'ImmunoCard C. difficile GDH consiste en une membrane maintenue dans un cadre en plastique avec deux puits d'échantillon et deux puits de réaction. Des anticorps vis-à-vis de la glutamate déshydrogénase sont immobilisés sur la membrane. Le conjugué enzymatique consiste en des anticorps de la glutamate déshydrogénase couplés à de la peroxydase de raifort. Pour réaliser le test, l'échantillon de selles du patient est dilué à l'aide du diluant échantillon et du conjugué enzymatique, puis le mélange est incubé pendant 15 minutes. Durant l'incubation, l'antigène GDH, s'il est présent, est lié aux anticorps anti-GDH du conjugué. À l'issue de l'incubation, une aliquote de mélange est ajoutée à chacun des deux puits d'échantillon, puis le test est incubé pendant cinq minutes supplémentaires entre 20 et 26°C. Durant la seconde incubation, le complexe GDH-conjugué est séparé des matières particulières tandis que la portion liquide de l'échantillon migre à travers la membrane vers les puits de réaction TEST et CONTROLE. Les complexes GDH-conjugué sont alors capturés au puits TEST par les anticorps immobilisés sur la membrane de réaction. Le second puits de réaction sert de contrôle interne. Les deux puits de réaction sont ensuite lavés avec une solution de lavage afin de diminuer l'interférence des protéines contaminantes avant l'ajout du substrat. Les tests de réaction sont incubés pendant cinq minutes supplémentaires, durant lesquelles le conjugué enzymatique réagit avec le substrat. Il en résulte l'apparition d'une couleur bleue. Les réactions sont lues visuellement. L'apparition d'une couleur bleue dans le puits de réaction TEST indique que le test est positif. Dans le puits CONTROLE, les anticorps anti-GDH du conjugué se lient directement aux anticorps immobilisés. L'apparition de bleu dans le puits de réaction CONTROLE indique que l'échantillon a été ajouté, que les réactifs étaient actifs au moment de l'utilisation et que la migration de l'échantillon s'est effectuée correctement.

## MATERIEL FOURNI

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

- Cartes de test ImmunoCard C. difficile GDH: une membrane logée dans un cadre en plastique et contenue dans une pochette en feuille d'aluminium avec un agent dessiccant. La membrane transporte les anticorps polyclonaux anti-GDH immobilisés vers les puits de réaction TEST et les anticorps anti-souris de chèvre vers les puits de réaction CONTROLE. Conserver les cartes de test entre 2 et 8°C lorsqu'elles ne sont pas utilisées.
- Contrôle positif ImmunoCard C. difficile GDH\*: *C. difficile* GDH dans un tampon protéique contenant 0,1 % de ProClin® et 0,03 % de gentamicine comme agents de conservation. Conserver entre 2 et 8°C entre les utilisations.
- ImmunoCard C. difficile GDH diluant échantillon/contrôle négatif\*: tampon protéique contenant 0,03 % de gentamicine et 0,02 % de thimérolal comme agents de conservation. Conserver entre 2 et 8°C entre les utilisations.
- ImmunoCard C. difficile GDH conjugué enzymatique\*: anticorps monoclonal anti-GDH conjugué à de la peroxydase de raifort en suspension dans un tampon protéique contenant de la gentamicine et du thimérolal (0,02 %). Conserver entre 2 et 8°C entre les utilisations.
- ImmunoCard solution de lavage I\*: solution tampon contenant du thimérolal (0,01 %) comme agent de conservation. Conserver entre 2 et 8°C entre les utilisations.
- ImmunoCard substrat I\*: solution tampon contenant de la tétraméthylbenzidine et du peroxyde. Conserver entre 2 et 8°C entre les utilisations.
- Des pipettes de transfert avec graduations pour 25 µL et 150 µL.

\* Dans un flacon compte-gouttes en plastique. Utiliser tel que fourni.

## MATERIEL NON FOURNI

- Dans gants en latex jetables doivent être utilisés durant la manipulation des échantillons fécaux qui sont considérés comme présentant un risque biologique potentiel
- Un vortex pour la suspension de l'échantillon de selles dans le diluant échantillon/Contrôle négatif
- Un minuteur
- Des bâtonnets applicateurs en bois
- De petits tubes à essais, par exemple de 10 x 75 mm ou de 12 x 75 mm

## PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
- Ne pas conserver à des températures supérieures à 2-8°C. Ne pas congeler.
- Ne pas dévier de la procédure établie, sinon les résultats pourraient être faussement positifs ou faussement négatifs.
- Certains échantillons de patient contiennent des agents infectieux; par conséquent, tous les échantillons doivent être manipulés et jetés comme présentant des risques biologiques potentiels.
- NE PAS mélanger les cartes de test, les conjugués enzymatiques et les réactifs de contrôle positif venant de coffrets ayant différents numéros de lot. Les autres réactifs (diluants échantillon/contrôle négatif, ImmunoCard solution de lavage I, ImmunoCard substrat I) peuvent être pris dans différents coffrets, à condition qu'ils ne soient pas périmés. Ne pas utiliser de réactifs après la date de péremption figurant sur les étiquettes.



- Tous les échantillons de selles doivent être soigneusement mélangés avant les tests, quelle que soit leur consistance, pour s'assurer qu'ils sont représentatifs avant les tests.
- Si les échantillons et les réactifs ne sont pas amenés à température ambiante (entre 20 et 26 C) avant les tests, la sensibilité des tests risque de diminuer.
- Inspecter la pochette en feuille d'aluminium des cartes de test. Ne pas utiliser les cartes de test dont la pochette en feuille d'aluminium est trouée ou n'a pas été complètement fermée. Ne pas utiliser les cartes de test si l'indicateur du dessiccatif a viré du bleu au rose. Des réactions faussement négatives peuvent en résulter, en raison de la détérioration des cartes de test qui n'ont pas été conservées correctement.
- Ne pas utiliser le diluant échantillon/contrôle négatif ou le contrôle positif s'ils sont décolorés ou troubles. La décoloration ou la turbidité peut être un signe de contamination microbienne. Il est normal que la solution de lavage paraisse légèrement trouble.
- L'ImmunoCard substrat I est sensible à la lumière et doit être conservé dans l'obscurité. L'aspect du réactif doit être transparent et incolore. Le jeter s'il présente une couleur ou s'il est trouble.
- Tenir les flacons de réactif à la verticale en dispensant les gouttes afin d'assurer que la taille et la distribution des gouttes sont constantes.

#### ATTENTION

- Les échantillons patients peuvent contenir des agents infectieux; les manipuler et les jeter comme présentant des risques biologiques potentiels.
- Jeter dans un conteneur approprié tous les matériaux de test utilisés. Traiter les déchets comme présentant des risques biologiques potentiels.

#### DANGER ET MISES EN GARDE

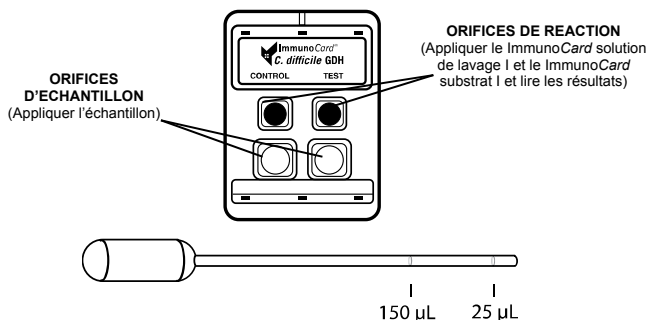
Pour les dangers et les précautions à prendre, se référer à la fiche de sécurité, disponible sur le site web de Meridian Bioscience [www.meridianbioscience.com](http://www.meridianbioscience.com) (US version) / [www.meridianbioscience.eu](http://www.meridianbioscience.eu) (EU version).

#### DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date de péremption du coffret figure sur l'étiquette. Conserver le coffret entre 2 et 8 C et le remettre rapidement au réfrigérateur après chaque utilisation.

#### REMARQUES SUR LA PROCEDURE

- La carte de test ImmunoCard et la pipette sont illustrées ci-dessous :



- Il est possible de procéder par série tout nombre d'échantillons ou de contrôles à condition de respecter, pour chaque carte, les étapes, la séquence d'ajout de réactif, l'incubation (attente) et les délais appropriés de lecture des résultats. Chaque étape de la procédure doit être achevée pour chaque échantillon avant de passer à l'étape suivante.
- Le côté gauche, le Contrôle de chaque carte fournit un contrôle interne pour chaque échantillon. Le teste l'échantillon individuellement pour assurer qu'il est suffisamment dilué et que le réactif est performant.

#### PREPARATION DES REACTIFS

Amener tout le coffret, y compris la pochette de cartes de test, entre 20 et 26 C avant utilisation. Aucune préparation de réactif n'est requise.

#### PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

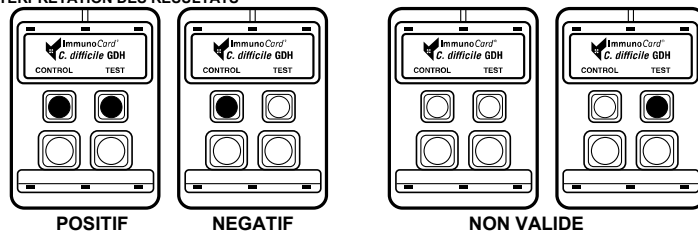
L'échantillon de selles doit être transporté dans un récipient étanche à l'air et conservé entre 2 et 8 C jusqu'au moment du test. L'échantillon doit être testé dès que possible, mais il peut être conservé jusqu'à cinq jours entre 2 et 8 C avant le test. Si le test ne peut être réalisé dans ces délais, les échantillons doivent être immédiatement congelés dès réception et conservés congelés ( $\leq -20$  C) jusqu'au moment du test. Dans ce cas, l'échantillon est conservable jusqu'à 30 jours et peut subir jusqu'à deux cycles de congélation/décongélation.

#### PROCEDURE DE TEST

- Amener toutes les cartes de test, les réactifs et les échantillons à température ambiante (20 à 26 C) avant de procéder aux tests. Sortir les réactifs du coffret pour les ramener à température ambiante. **Les réactifs peuvent prendre jusqu'à 60 minutes pour atteindre la température ambiante après réfrigération. LES RETOURNER ENTRE 2 ET 8 C IMMEDIATEMENT APRES UTILISATION.**
  - Étiqueter 1 tube à essai pour chaque échantillon patient à tester.
  - Ajouter 200 µL de diluant échantillon/contrôle négatif à un tube à essai en utilisant le compte-gouttes du flacon.
  - Ajouter immédiatement l'échantillon de selles ou le contrôle comme suit :
    - Selles liquides/semi-solides** – Mélanger soigneusement l'échantillon de selles. A l'aide d'une pipette de transfert propre (comprise dans le coffret), amener les selles jusqu'à la première marque à partir de l'extrémité du bout (25 µL). Dispenser les selles dans le diluant. Utiliser la même pipette pour mélanger les selles en aspirant délicatement, puis en refoulant la suspension à plusieurs reprises. Passer le mélange au vortex pendant 10 secondes. Laisser la pipette dans le tube pour l'utiliser ultérieurement au cours du test.\*
    - Selles formées/solides** – Mélanger soigneusement l'échantillon de selles. Utiliser un bâtonnet applicateur en bois et prélever une petite portion de selle (approximativement de 2 mm de diamètre) et la transférer dans le tube de diluant. Mélanger soigneusement l'émulsion obtenue avec le bâtonnet applicateur et ensuite passer au vortex pendant 10 secondes. Ajouter une pipette dans le tube pour l'utiliser ultérieurement au cours du test.\*
    - Contrôle facultatif** – à l'aide des flacons compte-gouttes, ajouter 1 goutte de contrôle positif ou de diluant échantillon/contrôle négatif au diluant. Passer au vortex pendant 10 secondes. Ajouter une pipette au tube pour l'utiliser ultérieurement au cours du test.
- \*REMARQUE: si la quantité d'échantillon transférée est trop faible ou si l'échantillon n'est pas mélangé et suspendu complètement dans le diluant, le résultat du test risque d'être faussement négatif. L'ajout d'une quantité d'échantillon trop importante peut entraîner des résultats non valides en raison du flux restreint de l'échantillon.**
- Ajouter 3 gouttes de conjugué enzymatique (150 µL) à chaque tube. Passer le mélange au vortex pendant 10 secondes. Laisser la pipette dans le tube pour l'utiliser ultérieurement au cours du test.
  - Laisser chaque échantillon dilué incubé pendant 15 minutes entre 20 et 26 C.
  - Utiliser 1 carte de test ImmunoCard pour chaque échantillon ou contrôle. Juste avant le test, sortir la carte de test ImmunoCard de sa pochette en feuille d'aluminium. Jeter la pochette et l'agent dessiccatif après examen. Inscrire le nom du patient ou du contrôle sur le dispositif.
  - Passer chaque échantillon ou contrôle au vortex pendant 10 secondes avant utilisation.
  - Ajouter 150 µL de chaque échantillon ou contrôle dilué à chacun des 2 puits échantillon sur 1 carte de test (150 µL représente le volume aspiré jusqu'au second trait de la pipette de transfert).
  - Incuber pendant 5 minutes entre 20 et 26 C.
- REMARQUE: à la fin de l'incubation, les deux puits de réaction doivent paraître complètement mouillés. Si l'un ou l'autre n'est pas complètement mouillé, jeter la carte de test et répéter la procédure. Procéder au test si un peu d'échantillon reste dans les puits d'échantillon mais que les puits sont complètement mouillés.**
- Tenir le flacon de l'ImmunoCard solution de lavage I à la verticale et ajouter exactement 3 gouttes dans chacun des puits de réaction.
  - Lorsque l'ImmunoCard solution de lavage I est complètement absorbée, tenir le flacon à la verticale et ajouter exactement 3 gouttes d'ImmunoCard substrat I.
  - Incuber la carte de test entre 20 et 26 C pendant 5 minutes.

- Lire visuellement les résultats de chaque carte dans les 30 secondes qui suivent la fin de l'incubation.

#### INTERPRETATION DES RESULTATS



NE LIRE QUE LES PUITS DE REACTION SUPERIEURS POUR INTERPRETER LES RESULTATS

**REMARQUE: ne pas tenir compte de l'apparition de couleur dans les puits d'échantillon. La couleur des puits d'échantillon n'est pas évaluée pendant le test.**

**Résultat de test positif:** couleur bleue dans les puits de réaction TEST (côté supérieur droit) et CONTROLE (côté supérieur gauche). L'intensité de la couleur bleue du puits TEST peut varier entre le bas et le haut de l'orifice. Un résultat de test positif indique que la GDH de *C. difficile* est présente dans l'échantillon. NOTE: le puits TEST peut paraître moins bleu que le puits CONTROLE.

**Résultat de test négatif:** couleur bleue dans les puits de réaction CONTROLE (côté supérieur gauche) uniquement. Les puits de réaction TEST (côté supérieur droit) doit être incolore. La membrane mouillée peut faire paraître les puits TEST légèrement gris. Un résultat de test négatif indique que la GDH de *C. difficile* est absente ou en-dessous de la limite de détection du test. Les puits TEST (côté supérieur droit) peut parfois laisser paraître une touche de couleur bleue sur son côté gauche ou droit, alors que le reste du puits est incolore. Dans ce cas, considérer que le résultat du test est négatif.

#### Résultats de test non valide:

- Pas de couleur bleue détectable dans les puits de réaction CONTROLE. Si la réaction CONTROLE échoue, les résultats du test ne sont pas valides. Un test non valide peut être dû au fait qu'un réactif ou que la carte de test n'a pas fonctionné correctement, que l'échantillon n'a pas été ajouté, qu'il n'a pas migré ou qu'il n'a pas été dilué correctement et a entraîné une surinoculation de la carte de test. Les échantillons présentant des niveaux extrêmement élevés de GDH peuvent également présenter un puits TEST positif et un résultat négatif au puits de réaction CONTROL.
- Un anneau bleu sur le cadre en plastique entourant le puits TEST (côté supérieur droit) pendant la procédure de test.

En cas de résultat non valide, refaire une dilution de l'échantillon et répéter le test sur 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.**

- Au moment de chaque utilisation, examiner visuellement le contenu du coffret pour s'assurer qu'il ne présente pas de signes évidents de contamination microbienne, de gel ou de fuite. Ne pas utiliser de réactifs contaminés ou suspects.
- La performance de chaque nouveau lot de coffret ou de chaque nouvelle livraison d'un coffret ImmunoCard GDH doit être vérifiée lors de la réception ou avant l'utilisation. Voir à la section INTERPRETATION DES RESULTATS ci-dessus la description des résultats attendus pour les réactifs de contrôle. Les tests doivent être considérés comme non valides lorsque l'un ou l'autre réactif de contrôle ne produit pas les résultats attendus. Dans ce cas, répéter les tests et les contrôles. Si, lors d'un test répété, les réactions attendues ne sont toujours pas observées avec des réactifs valides, contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou de son distributeur local pour plus d'assistance.
- Les contrôles servent à surveiller la réactivité du réactif. S'ils ne produisent pas les résultats attendus, cela peut signifier qu'un ou plusieurs des réactifs ne sont plus réactifs au moment de l'utilisation, que le test n'a pas été réalisé correctement ou que les réactifs ou les contrôles n'ont pas été ajoutés. **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.**
- Chaque carte de test contient un contrôle interne. L'apparition d'une couleur bleue dans les puits de réaction CONTROLE confirme que le test était actif au moment de l'utilisation, que l'échantillon a été ajouté et que la migration de l'échantillon s'est effectuée correctement.
- Une interférence de la matrice de l'échantillon n'a pas été observée avec ce test, car les échantillons sont substantiellement dilués dans le diluant échantillon avant d'être testés. Pour cette raison, les contrôles positif et négatif fournis sont préparés dans des matrices similaires au diluant échantillon fourni. Si des matériaux de contrôle dont la composition est identique à celle des échantillons de test sont préférés, l'utilisateur peut les préparer en diluant des échantillons positifs et négatifs connus dans le diluant échantillon, conformément à la section PREPARATION DES ECHANTILLONS de cette notice.

#### VALEURS ATTENDUES

La fréquence des diarrhées causées par *C. difficile*, associées à l'usage d'antibiotiques, dépend de plusieurs facteurs tels que: population testée, type d'établissement et de l'épidémiologie. L'incidence d'infection à *C. difficile* chez des patients soupçonnés d'avoir une diarrhée associée à l'usage d'antibiotiques est de 15-25 %<sup>4</sup> cependant les taux de positivité de différents établissements peuvent se trouver en dehors de cette plage. Dans les essais cliniques menés pour ce test, 975 échantillons d'hommes (45,7%) et de femmes (54,3%) ont été collectés. La population pédiatrique étudiée variait de 14 jours à 21 ans. La prévalence globale pour les populations étudiées était de 13,6%.

#### LIMITES DU TEST

- Le test est qualitatif et aucune interprétation quantitative ne doit être effectuée en rapport avec l'intensité de la couleur lors du rendu du résultat.
- Un résultat positif ne définit pas une maladie liée au *C. difficile* ou la présence de *C. difficile* toxigène; il indique uniquement la détection de l'organisme. Toutes les selles positives avec l'ImmunoCard *C. difficile* GDH doivent être testées par une autre méthode afin de confirmer la présence de *C. difficile* toxigène.
- Une réaction croisée avec l'ImmunoCard *C. difficile* GDH est observée avec le *Staphylococcus aureus* (Souche Cowan I).
- Les échantillons contenant du sang à des concentrations supérieures à 40 % produisent potentiellement des résultats faussement négatifs.
- Les recommandations SHEA / IDSA définissent la meilleure stratégie à adopter pour les tests *C. difficile*, comme effectuer les tests sur les selles diarrhéiques (non formées) uniquement, à moins qu'un iléus dû au *C. difficile* est suspecté. Le type d'échantillon le mieux approprié pour le diagnostic de l'infection à *C. difficile* est une selle aqueuse, molle ou non-formée. Parce que 10% ou plus des patients hospitalisés peuvent être colonisés par le *C. difficile*, l'évaluation d'une selle formée peut diminuer la spécificité du diagnostic des maladies associées au *C. difficile* (CDAD).<sup>5</sup>
- Durant les études cliniques, il y avait insuffisamment de données pour évaluer les performances du test dans les selles de patients âgés de 0 à 28 jours et de 18 à 21 ans.

#### PERFORMANCES DU TEST

L'ImmunoCard *C. difficile* GDH a été évalué par cinq sites indépendants situés dans l'ouest, le sud-ouest, le sud-est ou les régions du Midwest des Etats-Unis. Un total de 975 échantillons de patients qualifiés ont été évalués. Tous les échantillons ont été collectés de manière prospective. Les échantillons ont été recueillis auprès d'hommes (46 %) et de femmes (54 %) et classés comme solide (17,1 %), semi-solide (50,8 %), sanglante (0,5 %) et liquide (31,5 %). L'âge des patients variait de 14 jours à 111 ans. Aucune différence dans la performance du test n'a été observée selon l'âge ou sexe des patients. Les tableaux suivants montrent la performance du test par site et selon l'âge du patient.

Tableau 1. Performances par site

Site	Echantillons positifs			Echantillons négatifs		
	ImmunoCard C. difficile GDH/Culture	Sensibilité %	95 % IC	ImmunoCard C. difficile GDH/Culture	Spécificité % <sup>3</sup>	95 % IC
Total Sites	124/127	97,6 % <sup>1</sup>	93,3 – 99,2 %	738/848	87,0 % <sup>2</sup>	84,6 – 90,1 %
Site 1	32/32	100,0 %	89,3 – 100,0 %	165/205	80,5 %	74,5 – 85,3 %
Site 2	39/41	95,1 %	83,9 – 98,7 %	257/290	88,6 %	84,4 – 91,8 %
Site 3	35/36	97,2 %	85,8 – 99,5 %	140/168	83,3 %	77,0 – 88,2 %
Site 4	8/8	100,0 %	67,6 – 100,0 %	76/80	95,0 %	87,8 – 98,0 %
Site 5	10/10	100,0 %	72,2 – 100,0 %	100/105	95,2 %	89,3 – 97,9 %

<sup>1</sup> Trois des 3 échantillons faussement négatifs sont observés négatif lorsque testés avec un test GDH approuvé par la FDA

<sup>2</sup> Soixante quatorze des 110 échantillons faussement positifs sont observés positif lorsque testés avec un test GDH approuvé par la FDA.

<sup>3</sup> Se référer à la note du tableau 2.

Tableau 2. Performances suivant l'âge des patients

Âge du patient	Echantillons positifs			Echantillons négatifs		
	ImmunoCard C. difficile GDH/Culture	Sensibilité %	95 % IC	ImmunoCard C. difficile GDH/Culture	Spécificité % <sup>1</sup>	95 % IC
0-28 jours	0/0	N/A	N/A	1/1	100,0 %	20,7 – 100,0 %
29 jours à 2 ans	22/22	100,0 %	85,1 – 100,0 %	72/98	73,5 %	64,0 – 81,2 %
entre 2 et 12 ans	30/30	100,0 %	88,6 – 100,0 %	130/160	81,3 %	74,5 – 86,5 %
entre 12 et 18 ans	14/15	93,3 %	70,2 – 98,8 %	80/88	90,9 %	83,1 – 95,3 %
entre 18 et 21 ans	5/5	100,0 %	56,6 – 100,0 %	25/29	86,2 %	69,4 – 94,5 %
> 21 ans	53/55	96,4 %	87,7 – 99,0 %	430/472	91,1 %	88,2 – 93,3 %

<sup>1</sup> L'ImmunoCard C. difficile GDH a été conçu pour être un test très sensible avec une valeur prédictive négative (VPN) proche de 100% afin d'augmenter la probabilité que le test identifie tous les échantillons potentiellement positifs. En raison de la façon dont le test a été conçu, la limite inférieure de l'intervalle de confiance pourrait être inférieure à 90%. L'ImmunoCard C. difficile GDH montre une VPN de 99,6% (IC = 98,8 – 99,9%), ce qui démontre que le dosage est suffisamment sensible pour identifier la plupart des échantillons potentiellement positifs, augmentant ainsi la probabilité que tous les échantillons toxigènes soient identifiés dans un test ultérieur.

#### SENSIBILITE ANALYTIQUE

La sensibilité analytique du test ImmunoCard C. difficile GDH est de 10 ng / mL sur selle et de 1,0 ng/mL lorsque diluée dans un système non-matrice.

#### REPRODUCTIBILITE DU TEST

La précision du test, les variations intra et inter-essais ont été évaluées à l'aide d'un échantillonnage de référence préparés à partir de selles négatives inoculées avec l'antigène C. difficile GDH. L'échantillonnage pour l'étude de la reproductibilité consistait en des positifs modérés (n=3), des positifs faibles (n=3), des négatifs élevés (n=3) et d'un négatif (n=1). Le positif faible et le négatif élevé sont des préparations proches de la limite de détection du test. Chaque échantillon a été évalué deux fois par jour pendant cinq jours par trois laboratoires différents. La reproductibilité était de 99,7 %, sans variabilité intra-essai et inter-essai pour les échantillons préparés au-dessus ou en-dessous de la limite de détection du test.

#### REACTIONS CROISEES

Des études de réactivité croisée ont été effectuées avec des échantillons de selles positifs et négatifs inoculés avec des organismes bactériens ou fongiques à la concentration finale de 1,2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL ou à la concentration du virus supérieure à 1 x 10<sup>5</sup> TCID50/mL. Aucun des organismes listés n'a réagi avec l'ImmunoCard C. difficile GDH: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Groupe B, *Salmonella* Groupe C, *Salmonella* Groupe D, *Salmonella* Groupe E, *Serratia liquifaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Type 40, Adenovirus Type 41, Coxsackievirus Souche B4, Echovirus Souche 30, Rotavirus Souche WA.

Une réaction croisée est observée avec des selles inoculées par le *Staphylococcus aureus* (Souche Cowan I).

#### SPECIFICITE DU TEST

Les cultures C. difficile suivantes, provenant de sources différentes, ont été testées et produisent des réactions positives à une concentration de 1,2 x 10<sup>7</sup> UFC / mL avec le test ImmunoCard C. difficile GDH: Souches C. difficile toxigènes: 8864, 10463, 43598, 2004052, 2004111, 2004118, 2004205, 2004206, 2005070, 2005257, 2005325, 2006240, 2007431, 2007435, 2007858, 2008016, 2008029, 2008162, 2008188, 2008341, 2008351, 2009018, 2009065, 2009066, 2009099, 2009132, 2009155, 2009277, B1, B117, B18, BK6, CF1, G1, J7, K12, Y1 Souches C. difficile non-toxigènes: 11186, 234, 586, 611, 620, 2C62, 2C165, C122, UNC19904, X15076

#### TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Les substances suivantes, aux concentrations solvant / diluant spécifiées, n'interfèrent pas avec les résultats du test dans les concentrations finales présentées: Le sulfate de baryum (5 mg / mL), la graisse fécale (2,65 mg d'acide stéarique et 1,3 mg d'acide palmitique / mL), l'hémoglobine (3,2 mg / mL), Iodimium AD® (chlorhydrate de loperamide) (6,67 x 10<sup>3</sup> mg / mL), Kaopectate® (salicylate de bismuth) (0,87 mg / mL), métronidazole (12,5 mg / mL), mucine (3,33 mg / mL), Mylanta® (hydroxyde d'aluminium sans hydroxyde de magnésium) (4,2 mg / mL), Pepto-Bismol® (salicylate de bismuth) (0,87 mg / mL), polyéthylène glycol (79,05 mg / mL), Prilosec® (oméprazole) (0,5 mg / mL), siméthicone (0,625 mg / mL), Tagamet® (cimétidine) (0,5 mg / mL), Tums® (carbonate de calcium) (5,0 mg / mL), la vancomycine HCl (2,5 mg / mL), le sang total (40%), les globules blancs (5%).

Les échantillons contenant du sang total à des concentrations supérieures à 40 % peuvent produire des résultats faussement négatifs.

## ESPAÑOL



Un inmunoensayo rápido para la detección de antígenos de *Clostridium difficile* en materia fecal

REF 716050

IVD

Rx Only

#### USO INDICADO

ImmunoCard C. difficile GDH es un inmunoensayo rápido enzimático cualitativo, de exploración selectiva, que se usa para detectar el antígeno de la glutamato deshidrogenasa de *Clostridium difficile* en muestras de materia fecal humana, en personas en las cuales se sospecha infección por *C. difficile* (CDI en inglés). Esta prueba no distingue entre cepas productoras de toxina y cepas no productoras de toxina de *C. difficile*. A las muestras obtenidas a partir de pacientes que dan resultado positivo en esta prueba debe hacerse pruebas adicionales diseñadas para detectar las cepas de productoras de toxina y ayudar a diagnosticar la infección por *C. difficile* (ICD).

#### RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El *Clostridium difficile* constituye el agente etiológico principal a nivel mundial de diarrea intrahospitalaria. Las manifestaciones de la infección por *C. difficile* (ICD) varían desde una diarrea leve hasta un megacolon tóxico potencialmente mortal. Los factores de riesgo clásicos para una ICD intrahospitalaria incluyen el uso de antibióticos y la edad avanzada. No obstante, recientemente se ha visto más ICD fuera del entorno hospitalario sin los factores de riesgo que típicamente se han asociado con la infección por *C. difficile*.<sup>1</sup> Todas las cepas de *C. difficile* producen glutamato deshidrogenasa (GDH), la cual también se conoce con el nombre de antígeno común.<sup>2,3</sup> Algunas cepas de *C. difficile* producen las dos toxinas (toxina A y toxina B) que se han asociado con la enfermedad. Las cepas de *C. difficile* que no portan los genes de la toxina A y de la toxina B no se consideran patógenas. Las técnicas de laboratorio para la detección de *C. difficile* que no se basan en biología molecular se puede dividir en dos grupos principales: las que se hacen tomando como base las toxinas y las que no se hacen tomando como base las toxinas. Las pruebas que toman como base la producción de toxinas incluyen el inmunoensayo enzimático (EIA) para las toxinas A o las toxinas A y B y la citotoxina, que primordialmente detectan la toxina B. A pesar de que las pruebas que no toman como base la producción de toxinas, tales como la prueba de EIA para el antígeno GDH de *C. difficile* son más sensibles, debe hacerse un seguimiento con pruebas para *C. difficile* productora de toxinas.

#### PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

La prueba ImmunoCard C. difficile GDH consiste de una membrana sostenida por un marco de plástico con dos pocillos para muestra y dos pocillos para reacción. La membrana lleva anticuerpos inmovilizados contra la glutamato deshidrogenasa. El Reactivo de Conjugado Enzimático consiste en anticuerpos contra glutamato deshidrogenasa ligados a peroxidasa de rábano. Para realizar la prueba, la muestra de materia fecal del paciente se diluye con Diluyente de Muestra y Conjugado Enzimático, y la mezcla se incuba durante 15 minutos. Durante la incubación, si el antígeno de GDH está presente, se liga con los anticuerpos anti-GDH del conjugado. Después de la incubación, una alícuota de la muestra es añadida a cada uno de los dos pocillos de muestra, y la prueba se incuba durante cinco minutos adicionales a una temperatura de 20-26 °C. Durante la segunda incubación, el complejo GDH-Conjugado se separa de la materia en partículas a medida que la porción líquida de la muestra fluye a través de la membrana hacia los puertos de reacción de TEST y CONTROL. Luego, los complejos GDH-conjugado son capturados en el pocillo de reacción TEST por los anticuerpos inmovilizados en la membrana de reacción. El segundo de los dos pocillos de reacción sirve como control interno. Subsiguientemente, ambos pocillos de reacción se lavan con Reactivo de Lavado para disminuir la interferencia por proteínas contaminantes antes de añadir el Reactivo Substrato. Los pocillos de reacción se incuban por cinco minutos adicionales durante los cuales el Conjugado Enzimático modifica el Reactivo Substrato. El resultado es la aparición de un color azul. Las reacciones se leen visualmente. El desarrollo de un color azul en el pocillo de TEST indica un resultado positivo. En el pocillo de CONTROL los anticuerpos anti-GDH del conjugado se unen directamente a los anticuerpos inmovilizados. La aparición de un color azul en el pocillo de reacción CONTROL indica que la muestra fue añadida, que los reactivos estaban activos en el momento en que fueron usados y que ocurrió una migración adecuada 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.

- Tarjetas de Prueba ImmunoCard C. difficile GDH (ImmunoCard C. difficile GDH Test Cards):** Una alomohadilla de membrana empotrada en un armazón de plástico y envuelta en una bolsa de aluminio con desecante. La alomohadilla lleva anticuerpos policlonales anti-GDH inmovilizados en el puerto de reacción TEST y anticuerpos anti-murinos de Cabra en el puerto de reacción CONTROL. Almacene las tarjetas de prueba (Test Cards) entre 2 y 8 C cuando no las esté usando.
- Control Positivo (Positive Control):** GDH de *C. difficile* en una solución proteica tamponada que contiene 0,1 % de ProCin® y 0,03 % de gentamicina como agentes conservantes. Almacene entre 2 y 8 C cuando no se esté usando.
- Diluyente de Muestra/Control Negativo (Sample Diluent / Negative Control):** una solución tamponada que contiene 0,03 % de gentamicina y 0,02 % de timerosal como agentes preservantes. Almacene entre 2 y 8 C cuando no se esté usando.
- Conjugado Enzimático (Enzyme Conjugate):** anticuerpo anti-GDH monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano y suspendido en una solución proteica tamponada que contiene gentamicina y timerosal (0,02 %). Almacene entre 2 y 8 C cuando no se esté usando.
- Tampón de Lavado ImmunoCard I (ImmunoCard Wash Buffer I):** una solución tamponada que contiene timerosal al 0,01% como agente preservante. Almacene entre 2 y 8 C cuando no se esté usando.
- ImmunoCard Substrato I (ImmunoCard Substrate I):** una solución tamponada que contiene tetra-metil-bencidina y peróxido. Almacene entre 2 y 8 C cuando no se esté usando.
- Pipetas de transferencia plásticas con marcas para medir 25 µL y 150 µL.**  
\* En un vial con gotero de plástico. Listo para usar.

#### MATERIALES NO PROPORCIONADOS

- Guantes de látex desechables que deberían usarse mientras se manejan las muestras de materia fecal puesto que éstas se consideran material biológico potencialmente nocivo.
- Mezcle en un vórtex para lograr una suspensión de la muestra de materia fecal en el Diluyente de Muestras.
- Cronómetro de intervalos.
- Aplicadores de madera
- Tubos de ensayo pequeños (por ejemplo de 10 x 75 mm ó 12 x 75 mm)

#### PRECAUCIONES

- Todos los reactivos son sólo para el diagnóstico in vitro.
- No almacenar a temperaturas superiores a 2-8 C. No congelar.
- No desviarse del método establecido en el prospecto puesto que pueden ocurrir resultados positivos falsos o negativos falsos.
- Algunas muestras de pacientes contienen agentes infecciosos; por lo tanto, todas las muestras de los pacientes deberían manejarse y desecharse así fueran material biológico nocivo.
- NO intercambie la Tarjeta de Prueba ni los reactivos de Conjugado Enzimático y Control Positivo de distintos números de lote del equipo de pruebas. Los demás reactivos (Diluyente de Muestra / Control Negativo, Tampón de Lavado ImmunoCard I y Substrato ImmunoCard I) pueden intercambiarse entre los equipos de prueba con tal de que estos reactivos no hayan caducado. No use ningún reactivo después de la fecha de caducidad que traen marcada.
- Todas las muestras de materia fecal deben mezclarse minuciosamente antes de realizar la prueba independientemente de cual sea su consistencia, con el objeto de asegurar la obtención de una muestra representativa antes de realizar la prueba.
- El no hacer que las muestras y reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-26 C) antes de realizar la prueba puede disminuir la sensibilidad de la misma.
- Revise las Tarjetas de Prueba antes de sacarlas de la bolsa de papel metálico en que vienen. No utilice Tarjetas de Prueba 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 Prueba que no han sido almacenadas apropiadamente.

- No utilice el Diluyente de Muestras / Control Negativo 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 Reactivo de Lavado tenga una apariencia ligeramente turbida.
- El Substrato ImmunoCard I es sensible a la luz y debe almacenarse en lo oscuro. El reactivo debe tener una apariencia clara e incolora. Si el reactivo presenta cualquier color o si se ve turbio debe descartarse.
- Con el objeto de asegurar consistencia en el tamaño y administración de la gota mantenga los viales en posición vertical al dispensar las gotas.

#### ADVERTENCIAS

- Las muestras de los pacientes pueden contener agentes infecciosos y deben manejarse y desecharse como material biológico potencialmente nocivo.
- Deseche todos los materiales usados en la prueba en un recipiente apropiado para ello. Trate el material de desecho como si éste fuera potencialmente nocivo.

#### DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

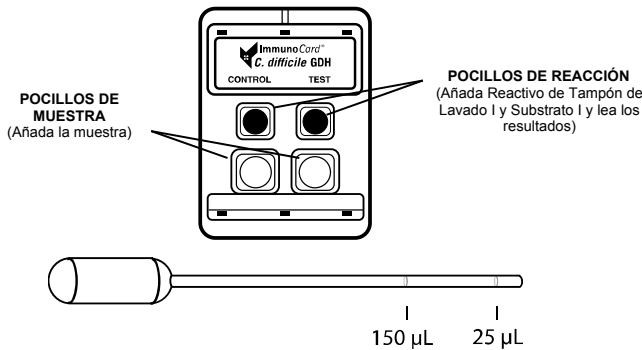
Se debe referir a los SDS, disponible en [www.meridianbioscience.com](http://www.meridianbioscience.com) (US version) / [www.meridianbioscience.eu](http://www.meridianbioscience.eu) (EU version), para las Frases de Peligro y Precaución.

#### VIDA ÚTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad del equipo está indicada en el rótulo del mismo. Almacene el equipo entre 2-8 C y póngalo de vuelta en el refrigerador justo después de cada uso.

#### NOTAS PARA EL PROCEDIMIENTO

- En el diagrama de abajo se muestran la Tarjeta de Prueba ImmunoCard y la pipeta:



- 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.
- 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.

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Haga que todos los reactivos del equipo de pruebas, incluso la bolsa que contiene las tarjetas de prueba alcancen una temperatura entre 20-26 C antes de usarlos. No se requiere preparación de reactivo adicional.

#### RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra de material fecal debe transportarse en un recipiente hermético y almacenarse entre 2-8 C hasta que se haga la prueba. La muestra debe analizarse lo más pronto posible, pero puede mantenerse entre 2-8 C hasta por un máximo de cinco días antes de analizarse. Si no se pueden analizar durante este período de tiempo, las muestras deben congelarse inmediatamente después de recibirse y almacenarse congeladas a  $\leq -20$  C hasta que se corra la prueba. Las muestras pueden almacenarse por 30 días y pueden ser congeladas/descongeladas dos veces.

#### PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Permita que todas las Tarjetas de Prueba, los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente (20-26 C) antes de realizar la prueba. Saque los reactivos de la caja del equipo (kit) para que se aclimaten. Después de refrigerarse los reactivos pueden tomarse hasta 60 minutos para aclimatarse. VUÉLVALOS A COLOCAR A 2-8 C INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE USARLOS.
- Marque 1 tubo de ensayo por cada muestra de paciente que vaya a evaluar con la prueba.
- Añada 200 µL de Diluyente de Muestra/Control Negativo al tubo de ensayo usando el gotero del frasco.
- Inmediatamente añada la muestra de materia fecal o control como se indica a continuación:
  - Muestras fecales líquidas o semi-sólidas** – Mezcle la muestra de materia fecal cuidadosamente. Utilizando una pipeta de transferencia limpia (está incluida con el equipo) aspire la materia fecal hasta la primera marca (25 µL) desde la punta de la pipeta y dispense dentro del Diluyente. 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. Deje la pipeta dentro del tubo para usarse en la prueba más adelante.\*
  - Muestras Formadas/Sólidas** – Mezcle la muestra de materia fecal cuidadosamente. Con un aplicador de madera transfiera una porción pequeña (aproximadamente de 2 mm en diámetro) de la muestra al Diluyente. Emulsifique la muestra con el aplicador y luego mezcle completamente usando un vórtex por 10 segundos. Añada una pipeta de transferencia al tubo para usarse en la prueba más adelante.\*
  - Control opcional** - usando los goteros de los recipientes añada 1 gota del Control Positivo o del Diluyente de Muestra/Control Negativo al Diluyente. Mezcle en un vórtex durante 10 segundos. Coloque una pipeta dentro del tubo y déjela allí para usar más adelante en la prueba.

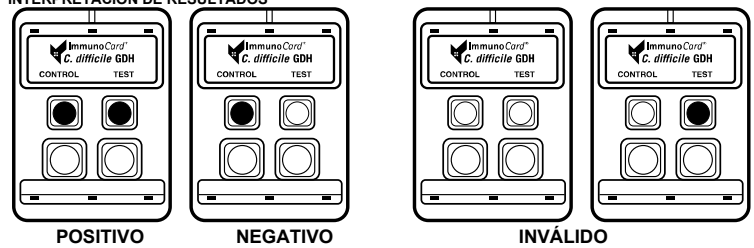
\*NOTA: la transferencia de muy poca muestra, o el no mezclar y suspender por completo la muestra en el Diluyente puede ocasionar un resultado negativo falso. La adición de demasiada muestra de materia fecal puede ocasionar resultados inválidos por causa de una restricción en el flujo de la muestra.

- Añada 3 gotas de Conjugado Enzimático (150 µL) por cada tubo. Mezcle con un vórtex durante 10 segundos. Deje la pipeta dentro del tubo para usar en la prueba más adelante.
- Deje reposar cada muestra diluida durante 15 minutos a una temperatura de 20-26 C.
- Use 1 Tarjeta de Prueba ImmunoCard por cada muestra o control. Cuando esté listo para realizar la prueba, saque la tarjeta de la bolsa metálica en que ésta viene. Deseche la bolsa y el desecante. Marque el dispositivo con el nombre del paciente o del control.
- Mezcle cada muestra o control con un vórtex durante 10 segundos antes de usarlos.
- Añada 150 µL de cada muestra diluida o de cada control (la segunda marca en la pipeta de transferencia representa 150 µL) a cada uno de los dos pocillos de muestra en una tarjeta de prueba (abajo).
- Incube durante 5 minutos a una temperatura de 20-26 C.

NOTA: al final de la incubación ambos puertos de reacción deben verse completamente mojados. Si el puerto 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.

- Sostenga el vial de Tampón de Lavado I (ImmunoCard Wash Buffer I) verticalmente y dispense exactamente 3 gotas a cada uno de los pocillos de reacción (arriba).
- Cuando el Tampón de Lavado I (ImmunoCard Wash Buffer I) se ha absorbido por completo, sostenga el vial de manera vertical y añada exactamente 3 gotas de Substrato I (ImmunoCard Substrate I).
- Incube la tarjeta de prueba durante 5 minutos a una temperatura entre 20-26 C.
- Lea los resultados de cada tarjeta visualmente dentro de los primeros 30 segundos después de la incubación.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



#### LEA SOLAMENTE LOS POCILLOS DE REACCIÓN SUPERIORES PARA INTERPRETAR LOS RESULTADOS

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

**Resultado positivo de la prueba:** Color azul en los pocillos de reacción de TEST (superior derecho) y de CONTROL (superior izquierdo). La intensidad del color azul en el puerto de TEST puede variar desde la parte inferior hasta la parte superior del pocillo. Un resultado positivo en la prueba indica que la GDH de *C. difficile* está presente en la muestra. POR FAVOR TENGA EN CUENTA QUE: El pocillo de TEST puede aparecer menos azul que el pocillo de CONTROL.

**Resultado negativo de la prueba:** Color azul solamente en el pocillo de reacción de CONTROL (superior izquierdo). El pocillo de reacción de TEST (superior derecho) debe ser incoloro. (Cuando la membrana se moja puede hacer que el pocillo de TEST se vea ligeramente gris). Un resultado negativo en la prueba indica que la GDH de *C. difficile* no está presente o que está presente por debajo del límite de detección de la prueba. Ocasionalmente el pocillo de TEST (superior derecho) puede mostrar un color azul leve al lado izquierdo o derecho del pocillo y el resto del mismo puede verse incoloro. Esto debe considerarse como un resultado negativo.

#### Resultados inválidos de la prueba:

- No se puede detectar ningún color azul en el pocillo de reacción de CONTROL. Una falla en el CONTROL invalida cualquier resultado de la prueba. Una prueba inválida puede deberse a una falla de un reactivo, o a un desempeño inadecuado de la Tarjeta de Prueba, a no haber añadido la muestra, a que la mezcla no migró o a no haber diluido la muestra correctamente lo cual causó una inoculación excesiva de la Tarjeta de Prueba. Las muestras con niveles excesivamente altos de GDH también pueden dar un resultado positivo en el pocillo de TEST y sin embargo dar negativo en el pocillo de CONTROL.
- Un anillo de color azul sobre el marco de plástico alrededor del pocillo de TEST (superior izquierdo) durante el procedimiento de la prueba. Cuando se obtienen resultados inválidos, vuelva a diluir la muestra y repita la prueba con una tarjeta nueva.

#### CONTROL DE CALIDAD

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

- Los componentes de cada equipo de prueba (kit) deben examinarse a simple vista para determinar la presencia de señales obvias de contaminación microbiana, congelamiento o derrame en el momento en que van a usarse. No use reactivos contaminados o que se sospeche que lo están.
- La ejecución de cada lote nuevo o cada nuevo embarque de la prueba ImmunoCard *C. difficile* GDH debe ser verificada al recibirlo o antes de usarlo. Ver la sección anterior de INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS donde se describen los resultados esperados para los reactivos de control. Las pruebas deben considerarse inválidas cuando cualquiera de los reactivos de control no producen los resultados esperados. En tales casos, vuelva a analizar todas las muestras y los controles. Si después de repetirse, aún no se observan los resultados esperados en reactivos que no hayan caducado, llame a Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 o a su distribuidor autorizado de Meridian y solicite ayuda.
- Los controles se usan para monitorizar la reactividad de los reactivos. Cuando los controles no producen los resultados esperados esto puede significar que uno o más de los reactivos han perdido su reactividad en el momento de usarse, que la prueba no se realizó correctamente o que los reactivos o muestras no fueron añadidos. 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 Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.
- 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.
- En esta prueba no se ha observado interferencia con la matriz de la muestra por lo que antes de realizar la prueba las muestras están lo suficientemente diluidas en Diluyente de Muestra. Por este motivo, los controles positivo y negativo que se suministran como parte de esta prueba se preparan en matrices similares a la del Diluyente de Muestra. Si se prefieren materiales de control cuya composición sea idéntica a la de las muestras a ser analizadas, el usuario lo puede preparar diluyendo muestras con un resultado positivo y negativo conocidos con Diluyente de Muestra, de acuerdo con la descripción hecha en la sección de PREPARACIÓN DE LA MUESTRA de este inserto.

#### VALORES ESPERADOS

La frecuencia de diarrea asociada a antibiótico causada por *C. difficile* depende de varios factores incluyendo: población de los pacientes, tipo de institución y epidemiología. La incidencia reportada en pacientes infectados con *C. difficile* que se sospechan tener diarrea asociada a antibiótico es 15-25 %<sup>4</sup> aunque diferentes facilidades pueden encontrar rangos positivos fuera de este margen. En los estudios clínicos que se llevaron a cabo para este ensayo, se recolectaron 975 muestras de hombres (45.7%) y mujeres (54.3%). Muestras pediátricas eran de 14 días a 21 años. La prevalencia en la población de los estudios clínicos fue de 13.6%.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La prueba es cualitativa y no debe hacerse ninguna interpretación cuantitativa con respecto a la intensidad del color al reportar el resultado.
- Un resultado positivo no confirma la existencia de enfermedad por causa de *C. difficile* o la presencia de cepas de *C. difficile* productoras de toxina; simplemente indica que el organismo fue detectado. Todas las materias fecales con un resultado positivo en la prueba ImmunoCard *C. difficile* GDH deben analizarse por otro método para verificar la presencia de *C. difficile* productor de toxina.
- Staphylococcus aureus* (Cowan strain I) fue encontrada a dar una reacción cruzada con ImmunoCard *C. difficile* GDH.
- Muestras que contienen una concentración de sangre completa mayor de 40 % tienen el potencial de producir resultados falsos negativos.
- Los renglones de SHEA/IDSA definen la mejor estrategia para la prueba de *C. difficile* como prueba que se ejecuta en muestras de diarrea (no-formadas), a menos que se sospeche ileus a causa de *C. difficile*. El tipo de muestra adecuada para la detección de *C. difficile* es diarrea acuosa, suelta o no-formada. Dado que 10% o más de los pacientes que están hospitalizados pueden estar colonizados con *C. difficile*, la evaluación de muestras formadas puede reducir la especificidad del diagnóstico de CDAD.<sup>5</sup>
- No hay suficiente data para evaluar el funcionamiento de esta prueba con muestras de pacientes entre 0-28 días de nacido y 18-21 años de edad.

#### CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

ImmunoCard *C. difficile* GDH fue evaluado por cinco localidades independientes en las regiones del Oeste, Suroeste y Medio-oeste de los Estados Unidos. Un total de 975 muestras de pacientes cualificados fueron evaluadas: Todas las muestras fueron recogidas de forma prospectiva. Las muestras se recogieron de hombres (46 %) y mujeres (54 %), y categorizadas como sólidas (17.1 %), semi-sólidas (50.8 %), sanguinolentas (0.5 %) y acuosas (31.5 %). La edad de los pacientes fue de 14 días a 111 años de edad. No se observó diferencia en la ejecución de la prueba basado en edad o género. Las siguientes tablas demuestran la ejecución del ensayo por localidad y edad del paciente.

Tabla 1. Características de ejecución por localidad

Sitio	Muestras Positivas			Muestras Negativas		
	ImmunoCard C. difficile GDH/Cultivo	Sensitividad %	95 % CI	ImmunoCard C. difficile GDH/Cultivo	Especificidad % <sup>3</sup>	95 % CI
Total Sitios	124/127	97,6 % <sup>1</sup>	93,3 – 99,2 %	738/848	87,0 % <sup>2</sup>	84,6 – 90,1 %
Sitio 1	32/32	100,0 %	89,3 – 100,0 %	165/205	80,5 %	74,5 – 85,3 %
Sitio 2	39/41	95,1 %	83,9 – 98,7 %	257/290	88,6 %	84,4 – 91,8 %
Sitio 3	35/36	97,2 %	85,8 – 99,5 %	140/168	83,3 %	77,0 – 88,2 %
Sitio 4	8/8	100,0 %	67,6 – 100,0 %	76/80	95,0 %	87,8 – 98,0 %
Sitio 5	10/10	100,0 %	72,2 – 100,0 %	100/105	95,2 %	89,3 – 97,9 %

<sup>1</sup> Tres de 3 falsos negativos dieron negativo con otra prueba de GDH aprobada por la FDA.  
<sup>2</sup> Setenta y cuatro de 110 falsos positivos dieron positivo por otra prueba de GDH aprobada por la FDA.  
<sup>3</sup> Vea la nota de pie de la Tabla 2.

Tabla 2. Característica de ejecución por edad del paciente

Edad del Paciente	Muestras Positivas			Muestras Negativas		
	ImmunoCard C. difficile GDH/Cultivo	Sensitividad %	95 % CI	ImmunoCard C. difficile GDH/Cultivo	Especificidad %	95 % CI
0-28 días	0/0	N/A	N/A	1/1	100,0 %	20,7 – 100,0 %
29 días a 2 años	22/22	100,0 %	85,1 – 100,0 %	72/98	73,5 %	64,0 – 81,2 %
> 2 años a < 12 años	30/30	100,0 %	88,6 – 100,0 %	130/160	81,3 %	74,5 – 86,5 %
12 años a < 18 años	14/15	93,3 %	70,2 – 98,8 %	80/88	90,9 %	83,1 – 95,3 %
18 años a 21 años	5/5	100,0 %	56,6 – 100,0 %	25/29	86,2 %	69,4 – 94,5 %
> 21 años	53/55	96,4 %	87,7 – 99,0 %	430/472	91,1 %	88,2 – 93,3 %

<sup>1</sup> La prueba ImmunoCard C. difficile GDH fue diseñada para que tuviera un nivel alto de sensibilidad como prueba primaria con un Valor Negativo Predecible (NPV) cerca de 100% y aumentar la posibilidad que la prueba identifique el mayor potencial de muestras positivas. Dado el diseño de la prueba, se espera que el límite bajo del rango de confianza pueda estar por debajo de 90%. ImmunoCard C. difficile GDH tiene un NPV de 99,6% (CI = 98,8 – 99,9%), el cual demuestra que la prueba es suficientemente sensible para identificar el mayor potencial de muestras positivas, de manera que aumenta la posibilidad de que todas las muestras toxigénicas sean identificadas por las pruebas subsiguientes.

**SENSIBILIDAD ANALÍTICA**

La sensibilidad analítica de la prueba ImmunoCard C. difficile GDH es 10 ng/mL en heces y 1,0 ng/mL cuando es diluido en un sistema no-matriz

**REPRODUCIBILIDAD**

La precisión del ensayo, la variabilidad intra-ensayo y la variabilidad inter-ensayo fueron evaluadas con un panel de referencia preparado de una combinación de muestras negativas donde se les añadió antígeno de C. difficile GDH. El panel de muestras de reproducibilidad consistió de positivos moderados (n=3), positivos débiles (n=3), altos negativos (n=3), y negativos (n=1). Las muestras positivas débiles y los altos negativos se prepararon cerca del límite de detección del ensayo. Cada muestra fue evaluada dos veces al día por cinco días consecutivos por tres laboratorios diferentes. La reproducibilidad fue 99,7% sin ninguna variabilidad en el intra-ensayo o inter-ensayo con muestras preparadas arriba o debajo del límite de detección de la prueba.

**REACTIVIDAD CRUZADA**

Estudios de reactividad cruzada fueron ejecutados con muestras de materia fecal positivas y negativas inoculadas con bacterias o hongos a una concentración de 1,2 x 10<sup>8</sup> CFU/mL o virus a una concentración mayor de 1 x 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL. Ninguno de los siguientes organismos en materia fecal reaccionaron con ImmunoCard C. difficile GDH: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium bifermians*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella Group B*, *Salmonella Group C*, *Salmonella Group D*, *Salmonella Group E*, *Serratia liquificiens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Type 40, Adenovirus Type 41, Coxsackievirus Strain B4, Echovirus Strain 30, Rotavirus Strain WA.

Muestras inoculadas con *Staphylococcus aureus* (Cowan strain I) se encontraron dar reacción cruzada con ImmunoCard C. difficile GDH.

**ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA**

Las siguientes cepas de cultivo de C. difficile de diferentes fuentes fueron probadas y produjeron reacción positiva a concentración de 1,2 x 10<sup>7</sup> CFU/mL con la prueba ImmunoCard C. difficile GDH:  
 Cepas de C. difficile Toxigénicas: 8864, 10463, 43598, 2004052, 2004111, 2004118, 2004205, 2004206, 2005070, 2005257, 2005325, 2006240, 2007431, 2007435, 2007858, 2008016, 2008029, 2008162, 2008188, 2008341, 2008351, 2009018, 2009065, 2009066, 2009099, 2009132, 2009155, 2009277, B1, B117, B18, BK6, CF1, G1, J7, K12, Y1

Cepas de C. difficile no-toxigénicas: 11186, 234, 586, 611, 620, 2C62, 2C165, C122, UNC19904, X15076

**PRUEBAS PARA SUBSTANCIAS INTERFERENTES**

Las siguientes sustancias, a las concentraciones especificadas de solvente/diluyente, no interfieren con los resultados de la prueba en las concentraciones listadas:  
 Sulfato de bario (5 mg/mL), grasa fecal (2,65 mg stearic acid and 1,3 mg palmitic acid/mL), hemoglobina (3,2 mg/mL), Imodium AD<sup>®</sup> (Loperamide HCl) (6,67 x 10<sup>3</sup> mg/mL), Kaopectate<sup>®</sup> (Bismuth subsalicylate) (0,87 mg/mL), Metronidazole (12,5 mg/mL), Mucin (3,33 mg/mL), Mylanta<sup>®</sup> (Aluminum hydroxide w/ magnesium hydroxide) (4,2 mg/mL), Pepto-Bismo<sup>®</sup> (Bismuth subsalicylate) (0,87 mg/mL), Polyethylene glycol (79,05 mg/mL), Prilosec<sup>®</sup> (Omeprazole) (0,5 mg/mL), Simethicone (0,625 mg/mL), Tagamet<sup>®</sup> (Cimetidine) (0,5 mg/mL), Tums<sup>®</sup> (Calcium carbonate) (5,0 mg/mL), Vancomycin HCl (2,5 mg/mL), sangre completa (40 %), globulos blancos (5 %).

Muestras que contienen una concentración de sangre completa mayor de 40 % tienen el potencial de producir resultados falsos negativos.

**DEUTSCH**



Ein schneller Enzym-Immunoassay zum Nachweis von Clostridium-difficile-Antigenen in Stuhl

REF 716050

IVD

Rx Only

**VERWENDUNGZWECK**

ImmunoCard C. difficile GDH ist ein qualitativer schneller Enzym-Immunoassay-Screening-Test für den Nachweis von Clostridium-difficile-Antigenen, Glutamatdehydrogenase, in Stuhlproben von Personen, bei denen eine C. difficile-Infektion (CDI) vermutet wird. Dieser Test differenziert nicht zwischen toxischen und nicht toxischen C. difficile-Stämmen. Proben von Patienten, die mit diesem Test positive Ergebnisse erbringen, sind weiteren Tests mit einem Assay zu unterziehen, die für den Nachweis von toxischen C. difficile-Stämmen und die Unterstützung der CDI-Diagnose konzipiert sind.

**ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS**

Weltweit hat sich Clostridium difficile zur wichtigsten Ursache nosokomialer Diarrhö entwickelt. C. difficile-Infektionen (CDI) können von leichter Diarrhö bis hin zum lebensbedrohlichen toxischen Megakolon reichen. Zu den klassischen Risikofaktoren für nosokomiale CDI zählen Antibiotikaaanwendung und höheres Alter. In jüngster Zeit wurde CDI jedoch häufiger außerhalb der Krankenhausumgebung und ohne die in der Vergangenheit normalerweise mit C. difficile-Infektionen assoziierten Risikofaktoren beobachtet.<sup>1</sup> Alle C. difficile-Stämme produzieren Glutamatdehydrogenase (GDH), auch als gemeinsames Antigen („common antigen“) bezeichnet.<sup>2,3</sup> Manche C. difficile-Stämme produzieren zwei Toxine (Toxin A und Toxin B), die beide mit Krankheiten assoziiert sind. C. difficile-Stämme ohne Toxin-A- und Toxin-B-Gene werden als nicht pathogen angesehen. Nicht-molekulare Labormethoden für den C. difficile-Nachweis lassen sich in zwei allgemeine Gruppen einteilen: auf Toxinbasis und nicht auf Toxinbasis beruhende Methoden. Zu den Assays auf Toxinbasis zählen Enzym-Immunoassays (EIA) auf Toxin A oder die Toxine A und B und Zytotoxin, primär für den Nachweis von Toxin B. Nicht auf Toxinbasis beruhende Assays, wie EIA auf C. difficile-GDH sind zwar naturgemäß empfindlicher, erfordern jedoch einen anschließenden Test auf toxische C. difficile.

**BIOLOGISCHE PRINZIPIEN**

ImmunoCard C. difficile GDH besteht aus einer Membran in einem Kunststoffrahmen mit zwei Probenöffnungen und zwei Reaktionsöffnungen. Die Membran leitet immobilisierte Antikörper zur Glutamatdehydrogenase. Das Enzym-Konjugat-Reagenz besteht aus Antikörpern gegen Glutamatdehydrogenase, gebunden an Meerrettichperoxidase. Für die Testdurchführung wird eine Stuhlprobe des Patienten mit Proben diluent und Enzym-Konjugat vermischt und die Mischung 15 Minuten lang inkubiert. Bei der Inkubation wird evtl. vorhandenes GDH-Antigen an die Anti-GDH-Antikörper des Konjugats gebunden. Nach der Inkubation wird eine Teilmenge der Mischung in jede der beiden Probenöffnungen gegeben und der Test weitere fünf Minuten bei 20–26 C inkubiert. Bei der zweiten Inkubation wird der GDH-Konjugat-Komplex von Feststoffen getrennt, während der flüssige Anteil der Probe durch die Membran zu den als „TEST“ und „CONTROL“ (Kontrolle) ausgewiesenen Reaktionsöffnungen fließt. Anschließend werden GDH-Konjugat-Komplexe an der als „TEST“ ausgewiesenen Reaktionsöffnung durch immobilisierte Antikörper in der Reaktionsmembran erfasst. (Die zweite der beiden Reaktionsöffnungen dient als interne Kontrolle.) Anschließend werden beide Reaktionsöffnungen mit Waschreagenz gespült, um Störungen durch Proteinkontaminationen vor der Zugabe des Substratreagenzes zu reduzieren. Die Reaktionsöffnungen werden weitere fünf Minuten lang inkubiert. Während dieser Zeitspanne wird das Substratreagenz durch das Enzyme Konjugate 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-GDH-Antikörper des Konjugats direkt an die immobilisierten Antikörper 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.

- ImmunoCard C. difficile GDH-Testkarten: Ein in einem Kunststoffrahmen befindliches Membrankissen, in einem verschlossenen Folienbeutel mit Trockenmittel. Das Kissen enthält immobilisierte polyklonale Anti-GDH-Antikörper an der „TEST“-Reaktionsöffnung und Anti-Ma-8-Antikörper (Ziege) an der „CONTROL“-Reaktionsöffnung. Die Testkarten bis zum Gebrauch bei 2–8 C lagern.
- ImmunoCard C. difficile GDH Positiv-Kontrolle: C. difficile-GDH in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,1 % ProClin<sup>®</sup> und 0,03 % Gentamicin als Konservierungsmitteln. Bis zum Gebrauch bei 2–8 C lagern.
- ImmunoCard C. difficile GDH Proben diluent/Negativ-Kontrolle: Eine gepufferte Proteinlösung mit 0,03 % Gentamicin und 0,02 % Thimerosal als Konservierungsmitteln. Bis zum Gebrauch bei 2–8 C lagern.
- ImmunoCard C. difficile GDH Enzym-Konjugat: Monoklonale Anti-GDH-Antikörper, konjugiert an Meerrettichperoxidase und suspendiert in einer gepufferten Proteinlösung mit Gentamicin und Thimerosal (0,02 %). Bis zum Gebrauch bei 2–8 C lagern.
- ImmunoCard Waschpuffer I\*: Eine gepufferte Lösung mit Thimerosal (0,01 %) als Konservierungsmittel. Bis zum Gebrauch bei 2–8 C lagern.
- ImmunoCard Substrat I\*: Eine gepufferte Lösung mit Tetramethylbenzidin und Peroxid. Bis zum Gebrauch bei 2–8 C lagern.
- Transferpipetten aus Kunststoff mit Skalierung für 25 µL und 150 µL.  
 \* In einem Tropffläschchen aus Kunststoff. Im Lieferzustand zu verwenden.

**BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN**

- Beim Umgang mit Stuhlproben sollten Einmal-Handschuhe aus Latex getragen werden, da derartige Proben potenziell biogefährlich sind
- Vortexmischer für das Suspendieren der Stuhlprobe im Proben diluent
- Intervallzeitgeber
- Applikatorstäbchen aus Holz
- Kleine Teströhrchen (bspw. 10 x 75 mm oder 12 x 75 mm)

**VORSICHTSMASSNAHMEN**

- Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Nicht bei Temperaturen über 2–8 C lagern. Nicht einfrieren.
- Abweichungen von der etablierten Methode der Packungsbeilage können zu falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnissen führen.
- Manche Patientenproben können Krankheitserreger enthalten. Daher sind alle Patientenproben als potenziell biogefährliche Substanzen zu handhaben und zu entsorgen.
- Testkarte, Enzym-Konjugat- und Positiv-Kontrolle-Reagenzien verschiedener Kit-Chargennummern NICHT gegeneinander austauschen. Die übrigen Reagenzien (Proben diluent/Negativ-Kontrolle, ImmunoCard Waschpuffer I, ImmunoCard Substrat I) können aus verschiedenen Kits stammen, vorausgesetzt, die Verfallsdaten der Reagenzien sind noch nicht abgelaufen. Kein Reagenz über das auf seinem Etikett angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
- Alle Stuhlproben ungeachtet ihrer Konsistenz vor dem Testen gut mischen, um repräsentative Proben zu gewährleisten.
- Werden Proben und Reagenzien vor dem Testen nicht auf Zimmertemperatur (20–26 C) gebracht, kann dies die Assay-Empfindlichkeit reduzieren.
- 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.
- Proben diluent/Negativ-Kontrolle oder Positiv-Kontrolle nicht verwenden, wenn sie verfärbt oder trübe aussehen. Verfärbung oder Trübheit können Anzeichen einer mikrobiellen Kontamination sein. In leicht trüben Aussehen des ImmunoCard Waschpuffers list normal.
- ImmunoCard Substrat I ist lichtempfindlich und im Dunkeln zu lagern. Das Reagenz sollte klar und farblos sein. Zeigt das Reagenz eine Färbung oder Trübheit, ist es zu entsorgen.
- Die Reagenzfläschchen bei der Tropfenabgabe senkrecht halten, um eine einheitliche Tropfengröße und Aufbringung zu gewährleisten.



## WARNUNG

1. Patientenproben können Krankheitserreger enthalten und sind daher als potenziell biogefährliche Substanzen zu handhaben und zu entsorgen.
2. Alle gebrauchten Testmaterialien in einem geeigneten Behälter entsorgen. Abfälle sind als potenziell biogefährliche Substanzen zu erachten.

## GEFÄHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

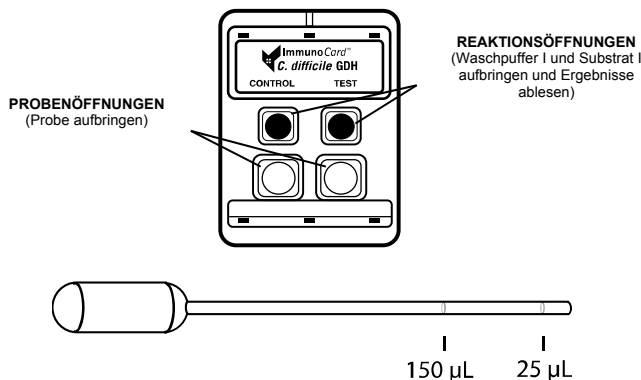
Für weitere Informationen zu den Gefahren- und Sicherheitshinweisen, beziehen Sie sich auf die SDS, die unter folgendem Link verfügbar sind: [www.meridianbioscience.com](http://www.meridianbioscience.com) (US Version) / [www.meridianbioscience.eu](http://www.meridianbioscience.eu) (EU Version).

## HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Kit-Verfallsdatum ist auf dem Kit-Etikett angegeben. Den Kit bei 2–8 °C lagern und nach jedem Gebrauch unverzüglich wieder in den Kühlschrank stellen.

## HINWEISE ZUR DURCHFÜHRUNG

1. Die ImmunoCard-Testkarte und die Pipette sind im Folgenden dargestellt:



2. Die chargenweise Verarbeitung einer beliebigen Anzahl von Proben oder Kontrollen ist möglich, sofern für jede Karte die entsprechenden Schritte durchgeführt sowie die Reihenfolge der Reagenzienzugabe, die Inkubationsdauer (Wartezeit) und die Zeitspanne bis zur Ergebnisauswertung 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.

## VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Den gesamten Kit, einschließlich des Beutels mit der Testkarte, vor Gebrauch auf 20–26 °C temperieren. Es ist keine weitere Vorbereitung der Reagenzien erforderlich.

## PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

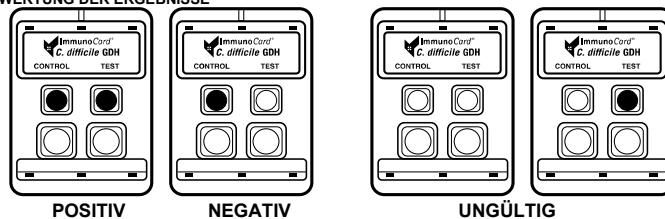
Die Stuhlprobe in einem luftdicht verschlossenen Behälter transportieren und bis zum Testen bei 2–8 °C lagern. Die Probe ist so bald wie möglich zu testen, kann jedoch vor dem Testen bei 2–8 °C bis zu fünf Tage lang aufbewahrt werden. Ist eine Testdurchführung innerhalb dieser Frist nicht möglich, können Proben unmittelbar nach Eingang eingefroren und bis zum Testen gefroren (bei ≤ -20 °C) gelagert werden. Eine Probe kann bis zu 30 Tage lang aufbewahrt und zweimal eingefroren und aufgetaut werden.

## 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. UNMITTELBAR NACH GEBRAUCH WIEDER BEI 2–8 °C LAGERN.**
  2. Für jede zu testende Patientenprobe 1 Teströhrchen kennzeichnen.
  3. Mit Hilfe des Flaschentropfers 200 µL Probendiluent/Negativ-Kontrolle in ein Teströhrchen geben.
  4. Unmittelbar danach folgendermaßen Stuhlprobe oder Kontrolle hinzugeben:
    - a. **Flüssige/halbste Stuhlproben** – die Stuhlprobe gründlich durchmischen. Mit Hilfe einer (im Kit enthaltenen) sauberen Transferpipette den Stuhl bis zur ersten Markierung ab dem Spitzende (25 µL) aufziehen. Den Stuhl in das Probendiluent abgeben. Den Stuhl durch behutsames Aspirieren mit Hilfe derselben Pipette mischen und die Suspension anschließend mehrmals abgeben. Das Gemisch 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer mischen. Die Pipette zur späteren Verwendung beim Test im Röhrchen belassen.\*
    - b. **Geformte/feste Stuhlproben** – die Stuhlprobe gründlich durchmischen. Mit Hilfe eines Applikatorstäbchens aus Holz einen kleinen Teil (ca. 2 mm Durchmesser) des Stuhls in das Probendiluent transferieren. Die Probe mit Hilfe des Applikatorstäbchens emulgieren und anschließend 10 Sekunden lang gründlich mit dem Vortexmischer mischen. Eine Pipette in das Röhrchen geben und zur späteren Verwendung beim Test dort belassen.\*
    - c. **Optionale Kontrolle:** Mit Hilfe der Behältertrichter 1 Tropfen der Positiv-Kontrolle oder der Negativ-Kontrolle (Probendiluent) zum Probendiluent hinzugeben. Mit dem Vortexmischer 10 Sekunden lang mischen. Eine Pipette in das Röhrchen geben und zur späteren Verwendung beim Test dort belassen.
- \*HINWEIS: Wird zu wenig Probe transferiert oder wird die Probe nicht vollständig im Probendiluent vermischt und suspendiert, kann dies zu einem falsch-negativen Testergebnis führen. Die Zugabe einer zu großen Stuhlprobenmenge kann auf Grund eingeschränkter Probenflusses zu ungültigen Ergebnissen führen.**
5. In jedes Röhrchen 3 Tropfen ImmunoCard *C. difficile* GDH Enzym-Konjugat (150 µL) geben. Das Gemisch 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer mischen. Die Pipette zur späteren Verwendung beim Test im Röhrchen belassen.
  6. Alle verdünnten Proben 15 Minuten lang bei 20–26 °C ruhen lassen.
  7. Für jede Probe oder Kontrolle jeweils 1 ImmunoCard-Testkarte verwenden. Die ImmunoCard-Testkarte unmittelbar vor Testbeginn aus ihrem Folienbeutel entnehmen. Beutel und Trockenmittel entsorgen. Die Vorrichtung mit dem Namen des Patienten bzw. der Kontrolle beschriften.
  8. Jede Probe bzw. Kontrolle vor ihrer Heranziehung 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer mischen.
  9. In jede der 2 Probenöffnungen von 1 Testkarte 150 µL jeder verdünnten Probe oder Kontrolle geben. (Die zweite Markierung der Transferpipette entspricht 150 µL.)
  10. Fünf Minuten lang bei 20–26 °C inkubieren.

**HINWEIS: Nach der Inkubation müssen beide Reaktionsöffnungen vollständig nass aussehen. Sollte eine der Reaktionsöffnungen nicht vollständig nass sein, die Testkarte verwerfen und das Verfahren wiederholen. Mit dem Testen fortfahren, falls noch Probe in den Probenöffnungen vorliegt, beide Reaktionsöffnungen jedoch vollständig nass sind.**
  11. Das Fläschchen mit dem ImmunoCard Waschpuffer I senkrecht halten und exakt 3 Tropfen in jede der Reaktionsöffnungen abgeben.
  12. Nachdem der ImmunoCard Waschpuffer I vollständig absorbiert ist, das Fläschchen senkrecht halten und exakt 3 Tropfen 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.**

## AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE



## FÜR DIE ERGEBNISAUSWERTUNG NUR DIE OBEREN REAKTIONSOFFNUNGEN 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 vom unteren Bereich zum oberen Bereich der Öffnung variieren. Ein positives Testergebnis bedeutet, dass die Probe *C. difficile*-GDH enthält. **ZUR BEACHTUNG:** Die „TEST“-Öffnung erscheint u. U. weniger blau, als die „CONTROL“-Öffnung.

**Negatives Testergebnis:** Blaue Färbung nur in der „CONTROL“-Öffnung (links oben). Die „TEST“-Reaktionsöffnung (rechts oben) sollte farblos sein. (Das Benässen der Membran kann dazu führen, dass die „TEST“-Öffnung leicht grau erscheint.) Ein negatives Testergebnis bedeutet, dass *C. difficile*-GDH nicht vorliegt bzw. nur in Mengen unterhalb der Assay-Nachweisgrenze. Mitunter kann die „TEST“-ÖFFNUNG (rechts oben) bei ansonsten farbloser Öffnung an der linken oder rechten Seite der Öffnung Anzeichen einer leichten Blaufärbung aufweisen. Dies ist als negatives Testergebnis 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 ergeben oder aus einer Fehlfunktion der Testkarte, aus der Unterlassung der Probenzugabe, aus dem Ausbleiben der Probenmigration, oder aus einer inkorrekten Probenverdünnung und einer sich hieraus ergebenden zu starken Inokulation der Testkarte. Proben mit extrem hohen GDH-Konzentrationen können auch bei positiver „TEST“-Öffnung, jedoch negativer „CONTROL“-Öffnung gegeben sein.
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

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

1. Die Kitkomponenten vor jedem Gebrauch auf offensichtliche Anzeichen von Mikrobenkontamination, Gefrieren oder Flüssigkeitsaustrittsicht prüfen. Kontaminierte oder fragwürdige Reagenzien nicht verwenden.
2. Die Leistung jeder neuen Kitcharge oder jeder neuen Lieferung des ImmunoCard GDH Tests soll bei Erhalt oder vor dem Gebrauch überprüft werden. Angaben zu den zu erwartenden Ergebnissen für Kontrollreagenzien bietet der vorhergehende Abschnitt AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE. Die Tests sind als ungültig zu erachten, wenn eines der Kontrollreagenzien nicht die erwarteten Ergebnisse erbringt. In derartigen Fällen sind die Tests und Kontrollen erneut zu analysieren. Lassen sich auch bei wiederholten Tests mit Reagenzien, deren Verfallsdaten noch nicht abgelaufen sind, die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte telefonisch Unterstützung von Meridians Technical Support Services (US-Rufnummer +1 800-343-3858) oder vom zuständigen Meridian-Vertriebshändler anfordern.
3. Die Kontrollen dienen zur Überwachung der Reagenzienreaktivität. Erbringen die Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse, kann dies bedeuten, dass mindestens eines der Reagenzien zum Zeitpunkt seiner Verwendung nicht mehr reaktionsfähig war, dass der Test nicht ordnungsgemäß durchgeführt wurde, oder dass Reagenzien oder Proben nicht hinzugegeben wurden. **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 Distributor.**
4. 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.
5. Bei diesem Assay wurden keine Probenmatrixstörungen beobachtet, da die Proben vor dem Testen stark mit Probendiluent verdünnt werden. Aus diesem Grund werden die als Assay-Bestandteile mitgelieferten Positive und Negative Kontrollen in Matrizes zubereitet, die dem Probendiluent gleichen. Falls die Zusammensetzung der Kontrollmaterialien mit der der Testproben identisch sein soll, kann der Anwender dies durch Verdünnen bekanntermaßen positiver und negativer Proben mit Probendiluent gemäß dem Abschnitt zur PROBENVORBEREITUNG in dieser Packungsbeilage erreichen.

## ERWARTETE WERTE

Die Häufigkeit der durch *C. difficile* verursachten antibiotika assoziierten Diarrhö ist abhängig von mehreren Faktoren, darunter: Patientenpopulation, Art der Einrichtung und Epidemiologie. Berichten zufolge beträgt die Inzidenz von *C. difficile*-Infektionen bei Patienten, die vermutlich an antibiotika assoziierter Diarrhö leiden, 15–25 %<sup>4</sup>. Jedoch können die Positivitätsquoten einzelner Einrichtungen außerhalb dieses Bereichs liegen. Während der klinischen Studien des Tests, stammten die Proben von 975 männlichen (45,7 %) und weiblichen (54,3 %) Patienten. Das Alter der pädiatrischen Patienten reichte von 14 Tagen bis 21 Jahren. In diesen klinischen Studien lag die Prävalenz in der Bevölkerung bei 13,6 %.

## EINSCHRÄNKUNGEN

1. Es handelt sich um einen qualitativen Test, und es darf bei der Ergebnisausgabe keine quantitative Interpretation hinsichtlich der Farbinzidenz gemacht werden.
2. Ein positives Ergebnis ist keine Definition für eine *C. difficile*-Erkrankung oder das Vorliegen von toxischem *C. difficile*, sondern zeigt lediglich den Nachweis des Organismus an. Alle für ImmunoCard *C. difficile* GDH positiven Stuhlproben sind mit einer weiteren Methode auf Toxine zu testen, um das Vorliegen von toxischem *C. difficile* zu bestätigen.
3. *Staphylococcus aureus* (Cowan-Stamm I) hat sich mit ImmunoCard *C. difficile* GDH als kreuzreaktiv erwiesen.
4. Proben mit Vollblutkonzentrationen von mehr als 40 % können potenziell falsch-negative Ergebnisse erbringen.
5. Die SHEA/IDSA Richtlinien empfehlen als beste Strategie für *C. difficile* Bewertung, dass nur ungeformten, flüssigen Stuhlproben zu testen sind außer wenn durch *C. difficile* verursachter Darmverschluss auftritt. Die geeigneten Stuhlproben für die Diagnose der *C. difficile* Infektion sind wässrige, lose oder ungeformte Stuhlproben. Weil 10% oder mehr der hospitalisierten Patienten mit *C. difficile* kolonisiert sein können, kann das Testen von festen Stuhlproben die Spezifität der CDAD Diagnose vermindern.<sup>5</sup>
6. Es gibt ungenügende Angaben, um die Leistung dieses Tests mit Proben von Patienten zwischen 0 bis 28 Tagen und von 18 bis 21 Jahren zu evaluieren.

## LEISTUNGSMERKMALE

ImmunoCard *C. difficile* GDH wurde von fünf unabhängigen Testzentren im Westen, Südwesten, Südosten und Mittleren Westen der USA untersucht. Es wurden insgesamt 975 qualifizierte Patientenproben untersucht; bei allen Proben handelte es sich um Prospektivproben. Die Proben stammten von männlichen (46 %) und weiblichen (54 %) Personen und wurden in die Kategorien fest (17,1 %), halbfest (50,8 %), blutig (0,5 %) und wässrig (31,5 %) unterteilt. Die Altersgruppen der Patienten reichten von 14 Tagen bis 111 Jahren. Es zeigten sich keine auf Alter oder Geschlecht der Patienten zurückzuführenden Testleistungunterschiede. In den folgenden Tabellen ist die Assay-Leistung nach klinischem Standort und Patientenalter aufgeführt.

**Tabelle 1. Leistungsmerkmale nach klinischem Standort**

Stand-ort	Positive Proben			Negative Proben		
	ImmunoCard C. difficile GDH/Kultur	Empfindlichkeit (in %)	95%-VB	ImmunoCard C. difficile GDH/Kultur	Spezifität (in %)	95%-VB
Standorte insgesamt	124/127	97,6 % <sup>1</sup>	93,3–99,2 %	738/848	87,0 % <sup>2</sup>	84,6–90,1 %
Standort 1	32/32	100,0 %	89,3–100,0 %	165/205	80,5 %	74,5–85,3 %
Standort 2	39/41	95,1 %	83,9–98,7 %	257/290	88,6 %	84,4–91,8 %
Standort 3	35/36	97,2 %	85,8–99,5 %	140/168	83,3 %	77,0–88,2 %
Standort 4	8/8	100,0 %	67,6–100,0 %	76/80	95,0 %	87,8–98,0 %
Standort 5	10/10	100,0 %	72,2–100 %	100/105	95,2 %	89,3–97,9 %

<sup>1</sup> Drei der 3 falsch negativen Ergebnisse waren negativ mit einem anderen FDA GDH "cleared" Test.  
<sup>2</sup> Vierundsiebzig der 110 falsch positiven Proben waren positiv mit einem anderen FDA GDH "cleared" Test.  
<sup>3</sup> Wenden Sie sich an tabelle 2 Fussnoten.

**Tabelle 2. Leistungsmerkmale nach Patientenalter**

Patientenalter	Positive Proben			Negative Proben		
	ImmunoCard C. difficile GDH/Kultur	Empfindlichkeit (in %)	95%-VB	ImmunoCard C. difficile GDH/Kultur	Spezifität (in %)	95%-VB
0–28 Tage	0/0	N/Z	N/Z	1/1	100,0 %	20,7–100,0 %
29 Tage bis 2 Jahre	22/22	100,0 %	85,1–100,0 %	72/98	73,5 %	64,0–81,2 %
>2 Jahre bis <12 Jahre	30/30	100,0 %	88,6–100,0 %	130/160	81,3 %	74,5–86,5 %
12 Jahre bis <18 Jahre	14/15	93,3 %	70,2–98,8 %	80/88	90,9 %	83,1–95,3 %
18 Jahre bis 21 Jahre	5/5	100,0 %	56,6–100,0 %	25/29	86,2 %	69,4–94,5 %
> 21 Jahre	53/55	96,4 %	87,7–99,0 %	430/472	91,1 %	88,2–93,3 %

Der ImmunoCard C. difficile GDH Test wurde ausgeführt als ein höchst empfindlicher Test mit einem negativen prädiktiven Wert von nahe 100% um die Wahrscheinlichkeit, von noch mehr potentiellen positiven Proben nachzuweisen. Wegen des Designs des Tests erwartet man, dass die tiefere Grenze des Vertrauensintervalls unter 90% liegt. Der ImmunoCard C. difficile GDH Test hat einen negativen prädiktiven Wert von 99,6% (VI: 98,8 - 99,9%), welcher beweist, dass der Test genug empfindlich ist, um meistens potentielle positive Proben nachzuweisen, vorausgesetzt die ansteigende Wahrscheinlichkeit, dass alle toxischen Proben durch nachfolgende Tests identifiziert wurden.

**ANALYTISCHE EMPFINDLICHKEIT**

Die Testempfindlichkeit des ImmunoCard C. difficile GDH-Tests beträgt bei Zusatz zu Stuhl 10 ng/mL und bei Verdünnung in einem matrix-freien System 1,0 ng/mL.

**REPRODUZIERBARKEIT**

Assay-Präzision, Schwankungen innerhalb eines Assays sowie Schwankungen zwischen Assays wurden anhand eines Referenzprofils aus Pools negativer Proben mit C. difficile GDH-Antigen-Zusatz beurteilt. Das Reproduzierbarkeitsprofil bestand aus mäßig positiven (n=3), schwach positiven (n=3), hochgradig negativen (n=3) und negativen (n=1) Proben. Die schwach positiven und die hochgradig negativen Proben wurden nahe der Assay-Nachweisgrenze angesetzt. Jede Probe wurde in drei verschiedenen Labors an fünf Tagen zweimal täglich untersucht. Die Wiederholbarkeit betrug bei über oder unter der Assay-Nachweisgrenze liegenden Probenzubereitungen 99,7 %, ohne Schwankungen innerhalb eines Assays bzw. zwischen Assays.

**KREUZREAKTIVITÄT**

Es wurden Kreuzreaktivitätsstudien mit positiven und negativen Stuhlproben durchgeführt, die mit Bakterien oder Pilzen auf Endkonzentrationen von 1,2 x 10<sup>8</sup> KBE/mL bzw. mit Virenkonzentrationen auf mehr als 1 x 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL beimpft waren. Keiner der folgenden im Stuhl vorhandenen Organismen reagierte mit ImmunoCard C. difficile GDH: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium bifermians*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonellen-Gruppe B*, *Salmonellen-Gruppe C*, *Salmonellen-Gruppe D*, *Salmonellen-Gruppe E*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus-Typ 40, Adenovirus-Typ 41, Coxsackievirus-Stamm B4, Echovirus-Stamm 30, Rotavirus-Stamm WA.

Mit *Staphylococcus aureus* (Cowan-Stamm I) versetzte Stuhlproben erwiesen sich als mit ImmunoCard C. difficile-GDH kreuzreaktiv.

**ANALYTISCHE EMPFINDLICHKEIT**

Die folgenden C.-difficile-Stammkulturen verschiedener Quellen ergaben beim Testen mit dem ImmunoCard C.-difficile-GDH-Assay positive Reaktionen bei 1,2 x 10<sup>7</sup> KBE/mL.  
 Toxigene C. difficile-Stämme: 8864, 10463, 43598, 2004052, 2004111, 2004118, 2004205, 2004206, 2005070, 2005257, 2005325, 2006240, 2007431, 2007435, 2007858, 2008016, 2008029, 2008162, 2008188, 2008341, 2008351, 2009018, 2009065, 2009066, 2009099, 2009132, 2009155, 2009277, B1, B117, B18, BK6, CF1, G1, J7, K12, Y1

Nicht toxische C. difficile-Stämme: 11186, 234, 586, 611, 620, 2C62, 2C165, C122, UNC19904, X15076

**STÖRSUBSTANZEN-TESTS**

Die folgenden Substanzen zeigten in den angegebenen gesättigten Lösungen/Verdünnungen und den aufgeführten Endkonzentrationen keine Auswirkungen auf die Testergebnisse:  
 Bariumsulfat (5 mg/mL), Stuhlöl (2,65 mg Stearinsäure und 1,3 mg Palmitinsäure/mL), Hämoglobin (3,2 mg/mL), Iodidum AD<sup>®</sup> (Loperamid-HCl, (6,67 x 10<sup>3</sup> mg/mL), Kaopectate<sup>®</sup> (Wismutsubsalicylat, 0,87 mg/mL), Metronidazol (12,5 mg/mL), Mucin (3,33 mg/mL), Mylanta<sup>®</sup> (Aluminiumhydroxid mit Magnesiumhydroxid, 4,2 mg/mL), Pepto-Bismol<sup>®</sup> (Wismutsubsalicylat, 0,87 mg/mL), Polyethylenglykol (79,05 mg/mL), Prilosec<sup>®</sup> (Omeprazol, 0,5 mg/mL), Simethicone (0,625 mg/mL), Tagamet<sup>®</sup> (Cimetidin) (0,5 mg/mL), Tums<sup>®</sup> (Calciumcarbonat, 5,0 mg/mL), Vancomycin-HCl (2,5 mg/mL), Vollblut (40 %), Leuzkozyten (5 %).

Proben mit Vollblutkonzentrationen von mehr als 40 % können potenziell falsch-negative Ergebnisse erbringen.

**REFERENCES**

- Dawson LF, Valiente E and Wren B *Clostridium difficile* - A continually evolving and problematic pathogen. Infection, Genetics and Evolution. 2009;9:1410-1417.
- Lyerly DM, Barroso LA and Wilkins TD Identification of the latex-reactive protein of *Clostridium difficile* as glutamate dehydrogenase. J. Clin. Micro 1991;29:2639-2642.
- Willis DH and Kraft JA Confirmation that the latex-reactive protein of *Clostridium difficile* is a glutamate dehydrogenase. J Clin Micro 1992;30:1363-1364.
- Barlett JG, Gerding D. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clin Inf Dis 2008;46:S12-18.
- Cohen SH et al. SHEA/IDSA Guideline. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA) 2010;31:431-455.



SN11084

REV. 12/16

**Manufactured By**

**Meridian Bioscience, Inc.**  
 USA/Corporate Office  
 3471 River Hills Drive  
 Cincinnati, Ohio 45244  
 Telephone: 513.271.3700  
 Orders/Customer Service:  
 800.543.1980  
 Technical Support Center:  
 800.343.3858  
 Information Fax: 513.272.5432  
 Ordering Fax: 513.271.0124

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

---

**Authorized Representative**

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

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

**INTERNATIONAL SYMBOL USAGE**

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:  
**Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guía de símbolos, Zeichenerklärung)**

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusqu' / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	<b>CONTROL +</b>	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
<b>LOT</b>	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	<b>CONTROL -</b>	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	<b>EC REP</b>	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostika 98/79/EG.	<b>SMP   PREP   DIL   SPE</b>	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenzubereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
<b>REF</b>	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence ou catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	<b>BUF   RXN</b>	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Reagents IVD reserves a Révaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <n> tests / Contiene sufficiente per "n" tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	<b>SOLN   STOP</b>	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	<b>CONJ   ENZ</b>	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugé enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
<b>SN</b>	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	<b>CONTROL</b>	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
<b>TEST</b>	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	<b>REAG</b>	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	<b>BUF   WASH</b>	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Lavage / Tampón de lavado / Waschlösung
<b>BUF</b>	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenza / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
<b>CONJ</b>	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	<b>DIL   SPE</b>	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillon / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
<b>SUBS</b>	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	<b>BUF   WASH   20X</b>	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentrierter Waschlösung
<b>R. Only</b>	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Sólo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	<b>DET   REAG</b>	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Détection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz

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