

immunocard STAT![®]

C. difficile GDH-AB

Rapid one-step Immunoassay for the Simultaneous Detection of *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase Antigen (GDH) and Toxins A and B in human Stool

REF 750520

IVD

INTENDED USE

Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB is a rapid, qualitative, immunochromatographic assay for the simultaneous detection, in human stool, of *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase antigen (GDH, also called "common antigen") and *Clostridium difficile* Toxins A and B. This assay is used as an aid in the diagnosis of C. difficile-associated disease and results should be used by the clinician in conjunction with clinical picture, other laboratory findings and epidemiological risk factors.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Clostridium difficile is a spore-forming, gram-positive, anaerobic bacterium that can be present asymptotically in up to 5% of the healthy population¹. Toxicogenic strains of *Clostridium difficile* represent the leading cause of nosocomial infectious diarrhea in developed countries, also representing the etiologic agent in approximately 25% of all cases of antibiotic-associated diarrhea². An estimated 300,000 cases of C. difficile infections (CDAD) are seen per year in U.S. hospitals alone.^{1, 2} Virtually any antibiotic can predispose a patient to CDAD. The clinical picture for CDAD ranges from asymptomatic colonization to life-threatening pseudomembranous colitis and toxic megacolon.² The pathogenic strains of C. difficile produce at least one of two biologically and immunologically distinct toxins³: toxin A (enterotoxin) and toxin B (cytotoxin), which are the main virulence factors responsible for the clinical signs of the disease.

Glutamate dehydrogenase (GDH), is an enzyme produced in large quantities by toxigenic and non-toxigenic strains of C. difficile, thus making it an excellent marker for determining the presence of this microorganism itself⁴.

The Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) recommend different testing approaches for the laboratory detection of toxigenic C. difficile⁵, including different combinations of GDH, toxins and NAAT assays. One of the suggested testing algorithms consists in the use of a two-step protocol, involving an initial screening of the sample with a GDH test and, if the result is positive, use of a second test to confirm the toxigenicity of the strain, as only the toxigenic and pathologic strains of this microorganism produce them. Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB enables a lab to adopt this approach, obtaining the two results simultaneously with a single-step assay.

A positive result in the test for the glutamate dehydrogenase of C. difficile confirms the presence of this organism in a fecal specimen; a negative result indicates the absence of the organism. A positive result in the test for toxins A and/or B confirms the presence of toxigenic C. difficile.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The test Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB contains two strips placed in a double cassette, one for GDH and one for Toxins A & B:

1. GDH strip uses a combination of:
 - a. Pink-Red latex particles conjugated to specific antibodies against C. difficile GDH and GDH specific antibodies immobilized in the Test Position, below the Control Band. During incubation, if GDH antigen is present, is bound to both the antibodies, developing a pink-red line at Test Position.
 - b. Blue latex particles conjugated to an antigen recognized by a specific antibody for this antigen, bound to the membrane, defining the Control Band of the test.
2. TOXINS strip uses a combination of:
 - a. Pink-Red latex particles conjugated to specific antibodies against toxin B and antibodies specific for toxin B immobilized in B Position, below the Control Band. During incubation, if Toxin B is present, is bound to both the antibodies, developing a pink-red line at B Position.
 - b. Pink-Red latex particles conjugated to specific antibodies against toxin A and antibodies specific for toxin A immobilized in A position, below the toxin B band. During incubation, if Toxin A is present, is bound to both the antibodies, developing a pink-red line at A Position.
 - c. Blue latex particles conjugated to an antigen recognized by a specific antibody for this antigen, bound to the membrane, defining the Control band of the test.

A diluted patient stool sample is dispensed into both sample ports of the cassette and migrates along the membranes through the Test and Control zones. After 15 minutes of incubation at room temperature, the appearance of a specific colored line in the reading window next to the corresponding letter indicates a positive result in the presence of the Control line (see Fig. 1).

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

1. Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB device: Two reactive strips housed in a plastic frame and enclosed in a foil pouch with a desiccant.
2. Sample Diluent vials: Buffered solution containing 0.095% of sodium azide as preservative. The diluent is supplied in a single use plastic dropper vial with an applicator stick. Use as supplied.
3. Disposable Transfer pipettes

MATERIALS NOT PROVIDED

1. External Control Set with Positive and Negative Controls. Meridian Cat. No 750501
2. Vortex
3. Interval Timer

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. Do not deviate from the method described here or falsely positive or falsely negative results may occur. Once the assay has started, complete all subsequent steps without interruption.

3. Patient specimen and used Immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB device may contain infectious agents and should be handled at Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/NIH manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories".
4. Do not interchange reagents from different kit lot numbers and do not use expired reagents.
5. Do not use the sample dilution buffer if there is evidence of contamination or precipitation.
6. The sample dilution buffer contains sodium azide which is a skin irritant. Avoid skin contact with reagents. Disposal of reagents containing sodium azide into lead or copper plumbing can result in the formation of explosive metal azides. This can be avoided by flushing with a large volume of water during such disposal.
7. Correct stool storage and correct stool dilution are essential to ensure correct results. Over-inoculation of stool into the Sample Diluent may restrict the flow within the Immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB device, determining invalid results. Incorrect stool storage or under-inoculation into the Sample Diluent may determine false negative results.
8. In case the primary packaging is damaged (foil pouch or diluent buffer vial) the product should be discarded and not used.
9. Do not use this product if a colored line appears in the result area of any strip before you start to use it.
10. If the test is stored refrigerated, allow all the kit components and faecal samples reach room temperature, because cold reagents and/or samples can reduce test functionality.
11. Do not discard the kit box until all the content has been used. This box contains essential information about the CE mark of the product and the batch number.
12. The used product should be discarded in compliance with current local laws

HAZARD AND PRECAUTIONARY STATEMENTS

There are no known hazards associated with this product.

SHELF LIFE AND STORAGE

Store the Immunocard STAT! C. *difficile* GDH-AB kit at 2-30 C when not in use. The kit expiration date is indicated on the kit label.

PROCEDURAL NOTES

1. Allow kit components and specimens to reach room temperature (19-27 C) before performing a test, as cold reagents and/or specimens may decrease assay sensitivity. Reagents may take up to 60 minutes to warm up following refrigeration.
2. Stool samples must be mixed thoroughly (regardless of consistency) prior to sampling to ensure a representative sample.
3. Hold reagent vials vertically when dispensing drops to ensure consistent drop size and delivery.
4. On occasion, particulate matter may interfere with sample flow. In cases when the Test Device does not readily absorb the diluted specimen, gently touch the bottom of the sample port with an applicator stick, moving the stool solid particle that might prevent the absorption. Alternatively, a new aliquot of the sample can be withdrawn from the Diluent and retested. Diluted samples containing a heavy concentration of particulate matter may be centrifuged (1-5 minutes at 700 x G) or allowed to stand for 3-5 minutes before proceeding.
5. Ensure to add the appropriate amount of sample (about 110 mg of stool) to the Sample Dilution Vial. If the sample is semi-liquid (difficult to be dispensed with a pipette) take a small portion of stool of about 5 mm diameter (quantity adequate for covering the grooves of the stick in the Sample Diluent cap). If the sample is liquid, add 110 µL to the Sample Diluent vial (4 drops if the disposable pipettes provided with the kit are used). Do not test any kind of specimen without the proper dilution in the Sample Diluent.
6. Ensure to add the correct volume of the extracted sample to the two sample ports marked with an arrow in the plastic device. If the volume is lower than indicated, the flow may not occur due to insufficient sample reaching the reaction strips; if the volume is higher, brown lines may appear instead of the expected ones (see Fig. 1).

REAGENT PREPARATION

Reagents are supplied ready to use. Allow kit components and specimens to reach room temperature (19-27 C) prior to use. Gently mix liquid reagent prior to use. Open the device pouch only when ready to run the assay.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The test is validated for fresh untreated samples. Do not use samples collected in transport media, or those with added preservative agents (such as formalin, SAF, PVA or similar) or enrichment media, as their presence could interfere with correct performance of the test.

Stool samples should be transported in an airtight container. The sample should be tested as soon as possible but may be held up to 2 days at 2-8 C prior to testing. If testing cannot be performed within this timeframe, samples should be frozen immediately upon receipt and stored frozen (-20 C) until tested. Samples may be frozen and thawed twice. Ensure the samples have reached room temperature before testing.

TEST PROCEDURE

Bring all test cards, sample diluents and samples to room temperature (19-27 C) before testing. Remove the reagents from the kit box to warm. Reagents may take up to 60 minutes to warm following refrigeration.

1. Label one Sample Diluent Vial for each patient sample to be tested.
2. Unscrew the cap from the vial with caution in order not to spill the sample diluent buffer.
3. Immediately add stool sample or controls as follows:
 - a. Formed/Solid stools – Mix the stool sample thoroughly. Using the stick attached to the vial cap, collect a small portion of 5 mm diameter.
 - b. Semi-solid stools - Mix the stool sample thoroughly. Using the stick attached to the vial cap, collect a sample amount that completely covers the grooves of the stick.
 - c. Liquid Stools - Using the disposable pipettes provided in the kit, mix the stool sample thoroughly, collect and dispense in the vial 4 drops of stool (corresponding to a volume of a 110 µL).
 - d. External Positive or Negative Control: refer to EXTERNAL CONTROL SET Instructions for Use.
4. Carefully add the sample into the corresponding vial containing the dilution buffer. Screw the cap firmly and shake it vigorously to ensure mixture homogenization.
5. Use 1 Immunocard STAT! Test Card for each Sample or Control. When ready to perform testing, remove the Test Card from its foil pouch. Discard the pouch and desiccant. Label the device with the name of the patient or the control.
6. Break the top of the vial cap using a piece of paper to prevent leakage.
7. Invert the vial and, keeping it in a vertical position, add 4 drops of diluted sample in the Sample Port of each strip (rectangular windows marked with an arrow).
8. Incubate the test card at 19-27 C for 15 minutes.
9. Visually read the results of each card within 30 seconds at the end of incubation.

INTERPRETATION OF RESULTS

The cassette contains two strips: on the left side the strip for GDH, on the right side the strip for toxins A and B. The possible outcomes are shown in Fig. 1.

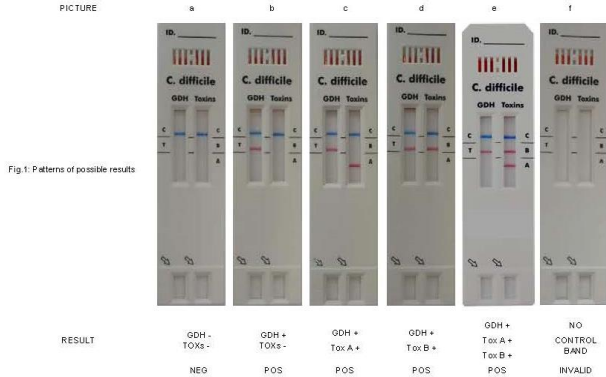


Fig. 1. Patterns of possible results

NEGATIVE RESULTS: A **BLUE** band at the Control Line position (C). No other bands are present in the two strips of the cassette.

A negative result in the GDH antigen strip indicates *C. difficile* antigen either is absent in the specimen or is below the detection limit of the assay. A negative result in the Toxins strip indicates either *C. difficile* toxins are absent in the specimen or they are below the detection limit of the assay.

POSITIVE RESULTS FOR GDH: A **PINK-RED** band at the TEST (T) Line Position, in the presence of a **BLUE** band at the Control Line Position (C) in the LEFT STRIP of the Cassette. A positive result indicates the presence of *C. difficile* in the sample.

POSITIVE RESULTS FOR TOXINS: A **PINK-RED** band at the TOXIN A (A) and/or the TOXIN B (B) Line Position, in the presence of a **BLUE** band at the Control Line Position (C) in the RIGHT STRIP of the Cassette. A positive result indicates the presence of *C. difficile* toxin(s).

Read immediately at the end of the Incubation period. Any **PINK-RED** band appearing at either the GDH, toxin A or toxin B test line position of the device after extended incubation times shall not be reported as positive.

INVALID RESULTS:

The test shall be considered invalid, and the results cannot be reported in case of:

- ABSENCE OF THE CONTROL LINES (**BLUE**) at the designated position for the Control Line (C). The test is invalid since the absence of a control band indicates that the test procedure was performed improperly, or deterioration of reagents has occurred.
- Presence of at least one line of the **WRONG COLOR** (for example: dark red, brown-red, and grey lines instead of **PINK-RED**). Bands with colors other than **PINK-RED** may indicate reagent deterioration, procedural mistakes, or the presence of interfering substances.

If any result is INVALID or difficult to interpret, the test shall be repeated on a new preparation of the with the same specimen (use a new Sample Diluent vial). If the original sample repeatedly produces unreadable results, obtain a new sample and retest.

IMPORTANT ADVICE:

Low percentage of specimens may result **negative for the GDH antigen but positive for the toxin(s)**. In such events, the test shall be considered "**not reportable**", and repeated after a new preparation of the original stool specimen (see above).

If the result does not change, the test must be repeated on a newly obtained stool specimen or it must be considered the use of an alternative additional diagnostic test, such as a NAAT assay for Tox A/Tox B genes detection on the original sample.

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, leakage or any damage.

INTERNAL CONTROLS: Internal controls are contained within the test strip and therefore are evaluated with each test.

- The **BLUE** bands appearing at the Control Line Positions serve as a procedural control and indicate that the test has been performed correctly, proper flow occurred, and the test reagents were active at the time of use.
- A clean background around the Control and Test Lines also serves as a procedural control. Control or test lines that are obscured by heavy background color may invalidate the test and may be an indication of reagent deterioration, use of an inappropriate sample or improper test performance.

EXTERNAL CONTROLS: External Positive and Negative Controls should be assayed with each new kit lot or new shipment. The number of tests performed with the external controls will be determined by the requirements of local, state, federal regulations or accrediting agencies. External controls are used to monitor reagent reactivity and test performance. Failure of the controls to produce the expected results can mean that one of the reagents or components is no longer reactive at the time of use, the test was not performed correctly or that reagents or samples were not added.

The results expected with the controls are described in the section INTERPRETATION OF RESULTS. If the expected control reactions are not observed, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. The kit should not be used if control tests do not produce the correct results.

EXPECTED VALUES

The frequency of antibiotic-associated diarrhea caused by *C. difficile* is dependent on several factors, including patient population, type of institution and epidemiology. The reported incidence of *C. difficile*-associated disease in patients suspected of having antibiotic-associated diseases is 15-20%, although different facilities may find positive rates above or below this range.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The assay is intended to confirm the presence of the GDH common antigen and toxins in patient's stool. A Negative Test result does not completely preclude an infection of a toxigenic *C. difficile* strain. Assay results are to be used in conjunction with information available from the patient clinical evaluation and other diagnostic procedures.
2. The test is qualitative and no quantitative interpretation should be made with respect to the intensity of the positive line when reporting the result.
3. The test is intended to be used on unpreserved human stool; any other kind of sample has not been validated.
4. Correct stool preservation is essential for reliable results. Sample degradation may determine False Negative results. While relatively stable at 2-8 C, *C. difficile* toxins - particularly at low concentrations - easily degrade at room temperatures. The rate at which the toxins degrade differs from patient sample to patient sample and therefore the rate cannot be predicted. For this reason, best practice requires that samples be refrigerated or frozen within two hours of collection and the samples tested within the timeframes recommended in this insert. Do not accept samples that have not been collected, handled or transported properly.
5. Two distinct groups have been identified that can harbor *C. difficile* asymptotically at very high rates. Colonization rates of up to 50% and higher have been reported in infants and rates of up to 32% in cystic fibrosis patients.
6. Failure to add the correct amount of stool to the Sample Diluent Vial can lead to falsely negative or falsely positive results.
7. Over incubation of tests may lead to false-positive test results. Incubating tests at reduced temperatures or times may lead to falsely negative results.
8. Highly hemorrhagic samples may interfere with the assay by determining a false negative result or the appearance of aspecific bands. This event is often accompanied by the alteration of the color of the bands. Do not report any result if the bands are not of the correct color (Control Lines must be **BLUE**, Test Lines must be **PINK-RED**) – Refer to Fig. 1.
9. International Guidelines recommend avoiding repeated testing and test of cure with any kind of *C. difficile* assay, because patients can shed spores, DNA and/or toxins of *C. difficile* for a prolonged time after resolution of diarrhoea or clinical recovery. For this reason, the performances of the test cannot be established to verify the efficacy of the eradication (test of cure).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical performances of Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB have been evaluated on a total of 304 samples for GDH and 180 samples for Toxins A and B. Specimen have been collected retrospectively and stored frozen. Two independent evaluations have been performed: one in the Manufacturer's Laboratories, one by an external independent clinical laboratory.

The samples have been characterized using commercial immunoassays for GDH and for TOXINS A&B. Discrepant results have been resolved with additional testing, including the gold standard "cell cytotoxicity & neutralization assay".

The Positive Agreement is used to assess the Sensitivity of the Immunocard STAT! *C.difficile* GDH-AB assay, while the Negative Agreement is used to assess its Specificity.

Comparative results below:

TABLE 1 – Manufacturer's Internal Evaluation

| COMPARATOR: ELISA C. DIFF CHECK – 60 | | | |
|---|-------|-------------|-------------|
| Immunocard STAT! <i>C.difficile</i> GDH-AB GDH assay | POS | NEG | TOTAL |
| POSITIVE | 53 | 0 | 53 |
| NEGATIVE | 0 | 87 | 87 |
| Total | 53 | 87 | 140 |
| | | % | CI 95% |
| Positive Agreement (Clinical sensitivity) | 53/53 | 100 | 93.2 – 100 |
| Negative Agreement (Clinical specificity) | 87/87 | 100 | 95.7 – 100 |
| COMPARATOR: ELISA PROSPECT | | | |
| Immunocard STAT! <i>C.difficile</i> GDH-AB TOXINS assay | POS | NEG | TOTAL |
| POSITIVE | 45 | 0 | 45 |
| NEGATIVE | 6* | 85 | 91 |
| Total | 51 | 85 | 136 |
| | | % | CI 95% |
| Positive Agreement (Clinical sensitivity) | 45/51 | 88.2 | 76.6 – 94.5 |
| Negative Agreement (Clinical specificity) | 85/85 | 100 | 95.6 – 100 |

*POSITIVE RESULTS confirmed by CECTNA (cell cytotoxicity & neutralization assay)

TABLE 2 – Independent Laboratory Evaluation

| Immunocard STAT1 C.difficile GDH-AB GDH assay | COMPARATOR: C. DIFF QUIK CHECK® | | |
|--|---|-------------|-------------|
| | POS | NEG | TOTAL |
| POSITIVE | 42 | 1** | 43 |
| NEGATIVE | 4* | 117 | 121 |
| Total | 46 | 118 | 164 |
| | | % | CI 95% |
| Positive Agreement (Clinical sensitivity) | 42/46 | 91.3 | 79.7 – 96.6 |
| Negative Agreement (Clinical specificity) | 117/118 | 99.2 | 95.4 – 99.8 |
| Immunocard STAT1 C.difficile GDH-AB TOXINS assay | COMPARATOR: C. DIFF QUIK CHECK® COMPLETE | | |
| | POS | NEG | TOTAL |
| POSITIVE | 19 | 0 | 19 |
| NEGATIVE | 5*** | 20 | 25 |
| Total | 24 | 20 | 44 |
| | | % | CI 95% |
| Positive Agreement (Clinical sensitivity) | 19/24 | 79.2 | 59.5 – 90.7 |
| Negative Agreement (Clinical specificity) | 20/20 | 100 | 83.9 – 100 |

RESOLUTION OF DISCREPANT RESULTS

The discrepant samples were analysed using the Techlab ELISA C. DIFF CHECKTM 60.

*Of the 4 samples Immunocard STAT GDH NEG/COMPARATOR POS, 2 were resolved as NEGATIVE, 1 was confirmed as POSITIVE.

** The Immunocard STAT GDH POS/ COMPARATOR NEG was resolved as NEGATIVE.

*** Of the 5 Immunocard STAT TOXINS NEG/COMPARATOR POS, 2 were resolved as NEGATIVE with the third assay (ELISA), 2 showed a Toxin concentration next to the LoD of the assay, 1 was POSITIVE.

ANALYTICAL SENSITIVITY

Limit of Detection of the assay (LoD) has been determined as follows:

- GDH assay: serial dilutions of *C. difficile* glutamate dehydrogenase from TCG BIOMICs was used to determine the LoD value. A mean value of **0.195 ng/mL** was obtained.
- TOX A&B assay: serial dilutions of toxins A and B from TCG BIOMICs were used to determine the LoD value. A mean value of **1.56 ng/mL** for toxin A and a mean value of **0.75 ng/mL** for toxin B were obtained.

REPRODUCIBILITY

INTER-DAY

Using the same batch of the Simple GDH-Toxins test, a sensitivity curve was measured, and real samples established as NC ("negative sample"), LPC ("weak positive sample") and PC ("positive sample") for each analyte, in duplicate, over a five-day period spaced outover time. The results were very reproducible obtaining maximum differences of ½ dilution.

INTER-OPERATOR PRECISION

In triplicate, three operators measured a sensitivity curve for each analyte and real samples established as NC ("negative sample"), LPC ("weak positive sample") and PC ("positive sample") for each analyte. The observed differences were not over ½ dilution with the standard in any of the cases, and the same results were obtained with the real samples.

INTER-BATCH PRECISION

Three different batches of the Simple GDH-Toxins test were evaluated in parallel by analysing the sensitivity curves and real samples established as NC ("negative sample"), LPC ("weak positive sample") and PC ("positivesample") for each analyte. The analysis was performed by one person on the same day. The maximum differences were less than or equal to ½ dilution with the standard, and the same results were obtained with the real samples, providing evidence of the test's high inter-batch precision.

The differences found in the "Reproducibility" sections are acceptable for a qualitative immunochromatographic technique with its inherent variability.

PROZONE / HOOK EFFECT

Very high concentrations of the three analytes detected by the assay have been tested without observing any decrease in the intensity of the positive signals. These concentration values (higher than the maximum values that can be found among the population) are the following ones:

- GDH: 6000 ng/mL, about 30000-fold the assay LoD.
- Toxin A: 3000 ng/mL, about 1900-fold the assay LoD.
- Toxin B: 3000 ng/mL, about 4000-fold the assay LoD.

INTERFERING SUBSTANCES

The substances indicated in the below at the concentration specified did not interfere with the results of the test when added to stool samples (positive and negative ones):

Whole blood 20% (v/v)
Vancomycin 1.17 mg/mL
Metronidazole 1.17 mg/mL
Pepto-Bismol 1% (v/v)
Omeprazole 11.7 µg/mL
Cimetidine 7.38 mg/mL
Paracetamol 2.34 mg/mL

Ibuprofen 1.41 mg/mL
Loperamide 9.38 µg/mL
Acetylsalicylic acid 2.34 mg/mL
Barium sulphate 4.4 mg/mL
Mucin 5% (w/w)
Stearic-palmitic acid (1:1)

CROSS REACTIVITY

Cross reactivity of the assay was evaluated for different bacteria that can be present in the intestinal tract. Two independent evaluations have been performed: one in the Manufacturer's Laboratories, one by an external independent clinical laboratory.

Manufacturer's Internal Evaluation

The test did not present cross-reactivity with any of the bacterial suspensions listed below:

| | |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 0.25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Salmonella</i> spp. | 0.25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Campylobacter coli</i> | 0.25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | 0.25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 0.25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | 1.56 x 10 ⁵ (CFU/mL) |
| <i>Giardia lamblia</i> (trophozoites) | 5.5 x 10 ⁶ (cells/mL) |
| <i>Giardia lamblia</i> (cysts) | 1.7 x 10 ⁶ (cells/mL) |

The test was evaluated against stools strongly positive for the following microorganisms without any cross-reactivity observed: Adenovirus, Rotavirus, Norovirus GII, Astrovirus, *Campylobacter* spp, *Helicobacter pylori*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*.

A cross-reaction with a stool sample strongly positive for *Entamoeba histolytica* has been registered (a weak positive result for Toxin B). However, further additional testing did not confirm the cross reaction.

Independent External Laboratory Evaluation

Stool samples inoculated with the following microbial agents (to a final sample concentration of ~ 1 x 10⁸ organisms/mL)

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus* spp, *Bacteroides nordii*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 2, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus gossleri*, *Listeria monocitogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexnerii*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

NONE of the listed organisms cross reacted with the assay.

INFORMATION & SUPPORT

For any technical inquiry and complaint, contact Meridian Bioscience Technical Support at +390331433636 – email: TS@meridianbioscience.com or call your Country Distributor (www.meridianbioscience.com/diagnostics/distributors/)

immunocard STAT!

C. difficile GDH-AB

Test immunologico rapido per il rilevamento simultaneo dell'antigene GDH (glutammato deidrogenasi) delle tossine A e B di *Clostridium difficile* nelle feci umane

REF 750520

IVD

FINALITÀ D'USO

Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB è un test rapido, qualitativo immunocromatografico per il rilevamento simultaneo, nelle feci umane, dell'antigene GDH (glutammato deidrogenasi, noto anche come "antigene comune") di *Clostridium difficile* e delle tossine A e B di *Clostridium difficile*. Questo test è da utilizzarsi come ausilio nella diagnosi di malattia associata a C. difficile; il medico dovrà valutare i risultati unitamente al quadro clinico, ad altri risultati di laboratorio e ai fattori di rischio epidemiologico.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il *Clostridium difficile* è un batterio anaerobio, gram-positivo, sporigeno che può essere presente asintomaticamente nel 5% della popolazione sana¹. I ceppi tossigenici di *Clostridium difficile* rappresentano la principale causa di diarrea infettiva nosocomiale nei paesi sviluppati, costituendo anche l'agente eziologico in circa il 25% di tutti i casi di diarrea associata agli antibiotici². Si stima che vi siano circa 300.000 casi di infezioni da C. difficile (CDAD) ogni anno solo negli ospedali degli Stati Uniti.^{1,2} Potenzialmente, qualsiasi antibiotico è in grado di predisporre un paziente alle CDAD. Il quadro clinico delle CDAD spazia dalla colonizzazione asintomatica a colite pseudomembranosa e megacolon tossico, pericolosi per la vita.² I ceppi patogeni di C. difficile producono almeno una di due tossine biologicamente e immunologicamente distinte³: la tossina A (enterotossina) e la tossina B (citotossina), che sono i principali fattori di virulenza responsabili dei segni clinici della malattia.

La glutammato deidrogenasi (GDH), è un enzima prodotto in grandi quantità da ceppi tossigenici e non tossigenici di C. difficile, rappresenta quindi un eccellente marcatore per determinare la presenza del microrganismo stesso.⁴

La Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), la Infectious Diseases Society of America (IDSA) e la European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) raccomandano diversi approcci di analisi per il rilevamento in laboratorio del C. difficile⁵ tossigenico, incluse diverse combinazioni di test per GDH, tossine e tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT). Uno degli algoritmi di test suggeriti consiste nell'uso di un protocollo in due fasi, che prevede uno screening iniziale del campione con un test per GDH e, se il risultato è positivo, l'uso di un secondo test per confermare la tossigenicità del ceppo, poiché solo i ceppi tossigenici e patologici di questo microrganismo producono le tossine. Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB consente al laboratorio di adottare questo approccio, ottenendo simultaneamente i due risultati con un unico test.

Un risultato positivo del test per la glutammato deidrogenasi di C. difficile conferma la presenza di questo organismo nel campione fecale; un risultato negativo indica l'assenza dell'organismo. Un risultato positivo del test per le tossine A e/o B conferma la presenza di C. difficile tossigenico.

PRINCIPI BIOLOGICI

Il test Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB contiene due strisce collocate in una doppia cassetta, una per il GDH e una per le tossine A e B:

1. La striscia GDH utilizza una combinazione di:
 - a. Particelle di lattice rosa-rosso coniugate ad anticorpi specifici anti-GDH di C. difficile e anticorpi specifici anti-GDH immobilizzati in Posizione Test, sotto la banda di Controllo. Durante l'incubazione, se l'antigene GDH è presente, si lega a entrambi gli anticorpi, sviluppando una linea rosa-rossa in Posizione Test.
 - b. Particelle di lattice blu coniugate a un antigene che viene riconosciuto da un anticorpo specifico per tale antigene, legato alla membrana, che definisce la banda di Controllo del test.
2. La striscia TOSSINE utilizza una combinazione di:
 - a. Particelle di lattice rosa-rosso coniugate ad anticorpi specifici per la tossina B e anticorpi specifici per la tossina B immobilizzati in Posizione B, sotto la banda di Controllo. Durante l'incubazione, se la tossina B è presente, si lega a entrambi gli anticorpi, sviluppando una linea rosa-rossa in Posizione B.
 - b. Particelle di lattice rosa-rosso coniugate ad anticorpi specifici per la tossina A e anticorpi specifici per la tossina A immobilizzati in Posizione A, sotto la banda della tossina B. Durante l'incubazione, se la tossina A è presente, si lega a entrambi gli anticorpi, sviluppando una linea rosa-rossa in Posizione A.
 - c. Particelle di lattice blu coniugate a un antigene che viene riconosciuto da un anticorpo specifico per tale antigene, legato alla membrana, che definisce la banda di Controllo del test.

Un campione diluito di feci del paziente viene dispensato in entrambe le porte del campione della cassetta e migra lungo le membrane attraverso le zone Test e Controllo. Dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la comparsa di una linea colorata specifica nella finestra di lettura accanto alla lettera corrispondente, in presenza della linea del controllo, indica un risultato positivo (vedere la Fig. 1).

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

1. Dispositivo Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB: due strisce reattive alloggiare in un supporto di plastica, confezionate in una busta di alluminio con un essiccante.
2. Diluente del Campione: soluzione tamponata contenente sodio azide allo 0,095% come conservante. Il diluente viene fornito in un flacone contagocce di plastica monouso con bastoncino applicatore. Pronto all'uso.
3. Pipette di trasferimento monouso

MATERIALI NON FORNITI

1. Set di Controllo Esterno con controlli positivi e negativi, num. cat. Meridian 750501
2. Vortex
3. Timer a intervalli

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro. Solo per uso professionale.
2. Seguire scrupolosamente la procedura qui descritta; in caso contrario, possono verificarsi risultati falsamente positivi o falsamente negativi. Una volta avviato il test, completare tutti i passaggi successivi senza interruzioni.
3. Il campione del paziente e il dispositivo Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB usato possono contenere agenti infettivi e devono essere trattati osservando il livello di biosicurezza 2 come raccomandato nel manuale CDC/NIH "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories" (Biosicurezza in microbiologia e nei laboratori biomedici).
4. Non scambiare i reagenti di kit con numeri di lotto diversi e non utilizzare i reagenti scaduti.
5. Non utilizzare il Diluente del Campione se c'è evidenza di contaminazione o precipitazione.
6. Il Diluente del Campione contiene sodio azide che è irritante per la pelle. Evitare il contatto dei reagenti con la pelle. Lo smaltimento di reagenti contenenti sodio azide nelle tubature in piombo o in rame può causare la formazione di azzidi metalliche esplosive. Ciò può essere evitato sciacquando con abbondante acqua durante lo smaltimento.
7. La corretta conservazione e diluizione delle feci sono essenziali per garantire risultati corretti. L'aggiunta eccessiva di feci nel Diluente del Campione può limitare il flusso all'interno del dispositivo Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB, producendo risultati invalidi. L'errata conservazione delle feci o l'aggiunta insufficiente nel Diluente del Campione possono determinare risultati falsi negativi.
8. Nel caso in cui l'imballaggio primario sia danneggiato (busta di alluminio o flacone di diluente), il prodotto deve essere smaltito e non va utilizzato.
9. Non utilizzare questo prodotto se, prima dell'uso, appare una linea colorata nell'area dei risultati di qualsiasi striscia.
10. Se il test viene conservato in frigorifero, attendere che tutti i componenti del kit e i campioni fecali raggiungano la temperatura ambiente, poiché i reagenti e/o i campioni freddi possono ridurre la funzionalità del test.
11. Non gettare la scatola del kit finché non sarà stato utilizzato tutto il contenuto. La scatola contiene informazioni essenziali sul marchio CE del prodotto e sul numero di lotto.
12. Il prodotto usato deve essere smaltito in conformità alle leggi locali vigenti.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Per le nostre attuali conoscenze, non ci sono rischi associate a questo prodotto.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Conservare il kit Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB a 2-30 C quando non in uso. La data di scadenza è riportata sull'etichetta del kit.

NOTE PROCEDURALI

1. Prima di eseguire l'analisi, lasciare che i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (19-27 C), poiché reagenti e/o campioni freddi possono ridurre la sensibilità del test. Potrebbero essere necessari 60 minuti prima che i reagenti si riscaldino dopo la refrigerazione.
2. Prima del campionamento, al fine di ottenere un campione rappresentativo, i campioni di feci devono essere miscelati accuratamente (indipendentemente dalla consistenza).
3. Tenere i flaconi dei reagenti in posizione verticale quando si dispensano le gocce, in modo da assicurare una regolare erogazione ed una costante dimensione delle gocce.
4. Talvolta il particolato può interferire con il flusso dei campioni. Nei casi in cui il dispositivo di analisi non assorba prontamente il campione diluito, toccare con delicatezza il fondo della porta del campione con un bastoncino applicatore, spostando il particolato solido delle feci che potrebbe impedire l'assorbimento. In alternativa, è possibile prelevare un'altra aliquota dal diluente e ricominciare. I campioni diluiti contenenti un'elevata concentrazione di particolato possono essere centrifugati (1-5 minuti a 700 x G) oppure lasciati riposare per 3-5 minuti prima di procedere.
5. Assicurarsi di aggiungere la quantità appropriata di campione (circa 110 mg di feci) nella fiala di diluizione del campione. Se il campione è semiliquido (difficile da dispensare con una pipetta) prelevare una piccola porzione di feci di circa 5 mm di diametro (quantità adeguata a coprire le scanalature del bastoncino nel tappo del diluente del campione). Se il campione è liquido, aggiungere 110 µL nella fiala del diluente per campioni (4 gocce se si utilizzano le pipette monouso fornite con il kit). Non analizzare alcun tipo di campione senza adeguata diluizione nel diluente per campioni.
6. Assicurarsi di aggiungere il volume corretto del campione estratto dalle due porte del campione contrassegnate dalle frecce nel dispositivo di plastica. Se il volume è inferiore a quanto indicato, il flusso potrebbe non verificarsi poiché la quantità di campione che raggiunge le strisce reattive è insufficiente; se il volume è maggiore, potrebbero apparire delle linee marroni invece di quelle previste (vedere la Fig. 1).

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti sono pronti all'uso. Prima dell'uso, lasciare che i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (19-27 C). Miscelare delicatamente il reagente liquido prima dell'uso. Aprire la busta del dispositivo solo quando si è pronti a eseguire il test.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il test è validato per campioni freschi non trattati. Non utilizzare campioni raccolti su terreni di trasporto o campioni trattati con agenti conservanti (come formalina, SAF, PVA o simili) o terreni di arricchimento, in quanto la loro presenza potrebbe interferire con le corrette prestazioni del test.

I campioni di feci devono essere trasportati in un contenitore ermetico. I campioni devono essere analizzati appena possibile, ma possono essere conservati per un massimo di 2 giorni a 2-8 C prima dell'analisi. Se il test non può essere eseguito entro questo lasso di tempo, i campioni devono essere congelati immediatamente appena ricevuti e conservati congelati (-20 C) fino al momento dell'analisi. I campioni possono essere congelati e scongelati due volte. Assicurarsi che i campioni abbiano raggiunto la temperatura ambiente prima di eseguire il test.

PROCEDURA DEL TEST

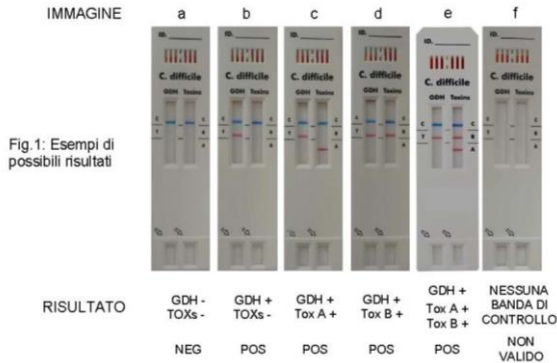
Portare tutte i Dispositivi Test, i diluenti dei campioni e i campioni a temperatura ambiente (19-27 C) prima di eseguire il test. Rimuovere i reagenti dalla scatola del kit per lasciarli riscaldare. Potrebbero essere necessari fino a 60 minuti prima che i reagenti si riscaldino dopo la refrigerazione.

1. Etichettare un flacone di Diluente del Campione per ciascun campione da analizzare.
2. Svitare il tappo del flacone con cautela per evitare di versare il diluente del campione.
3. Aggiungere immediatamente il campione di feci o i controlli come segue:
 - a. Feci formate/solide – Miscelare accuratamente il campione di feci. Usando il bastoncino fissato al tappo del flacone, prelevare una piccola porzione di 5 mm di diametro.
 - b. Feci semisolide – Miscelare accuratamente il campione di feci. Usando il bastoncino fissato al tappo del flacone, prelevare una quantità di campione tale da coprire completamente le scanalature del bastoncino.
 - c. Feci liquide – Utilizzando le pipette monouso fornite nel kit, miscelare accuratamente il campione di feci, prelevare e dispensare nel flacone 4 gocce di feci (corrispondenti a un volume di 110 µL).
 - d. Controllo positivo o negativo esterno: consultare le istruzioni per l'uso del SET DI CONTROLLO ESTERNO.
4. Aggiungere con cautela il campione nel flacone corrispondente contenente il tamponcino di diluizione. Avvitare saldamente il tappo e agitarlo energicamente per garantire l'omogeneizzazione della miscela.
5. Utilizzare 1 Dispositivo Test Immunocard STAT! per ciascun campione o controllo. Quando si è pronti per eseguire il test, rimuovere il Dispositivo

6. Test dalla busta di alluminio. Smaltire la busta e l'essiccante. Etichettare il dispositivo con il nome del paziente o del controllo.
7. Rompere la parte superiore del tappo del flacone utilizzando un pezzo di carta per evitare perdite.
8. Capovolgere il flacone e, mantenendolo in posizione verticale, aggiungere 4 gocce di campione diluito nella porta del campione di ciascuna striscia (finestre rettangolari contrassegnate da una freccia).
9. Incubare i Dispositivi Test a 19-27 °C per 15 minuti.
10. Leggere visivamente i risultati di ciascun Dispositivo entro 30 secondi alla fine dell'incubazione.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La cassetta contiene due strisce: sul lato sinistro la striscia per il GDH, sul lato destro la striscia per le tossine A e B. I risultati possibili sono mostrati nella Fig. 1.



RISULTATI NEGATIVI: una banda **BLU** nella posizione della linea del Controllo (C). Non sono presenti altre bande nelle due strisce della cassetta. Un risultato negativo nella striscia dell'antigene GDH indica che l'antigene di *C. difficile* è assente nel campione o è al di sotto del limite di rilevabilità del test.

Un risultato negativo nella striscia delle tossine indica che le tossine di *C. difficile* sono assenti nel campione o sono al di sotto del limite di rilevabilità del test.

RISULTATI POSITIVI PER GDH: una banda **ROSA-ROSSA** nella posizione della linea del TEST (T), in presenza di una banda **BLU** nella posizione della linea del Controllo (C) nella STRISCIA SINISTRA della cassetta. Un risultato positivo indica la presenza di *C. difficile* nel campione.

RISULTATI POSITIVI PER TOSSINE: una banda **ROSA-ROSSA** nella posizione della linea della TOSSINA A (A) e/o della TOSSINA B (B), in presenza di una banda **BLU** nella posizione della linea del Controllo (C) nella STRISCIA DESTRA della cassetta. Un risultato positivo indica la presenza di tossine di *C. difficile*.

Al termine del periodo di incubazione, procedere immediatamente alla lettura. Se, dopo tempi di incubazione prolungati, in corrispondenza della posizione della linea di test GDH, tossina A o tossina B del dispositivo appare una banda di colore **ROSA-ROSSA**, non deve essere refertata come positive.

RISULTATI INVALIDI:

Il test è da considerarsi non valido e i risultati non devono essere refertati in caso di:

- **ASSENZA DELLE LINEE DI CONTROLLO (BLU)** nella posizione designata per la linea del controllo (C). Il test non è valido perché l'assenza di una banda del controllo indica che la procedura di test è stata eseguita in modo improprio o si è verificato un deterioramento dei reagenti.
- Presenza di almeno una linea di **COLORE ERRATO** (ad esempio: linee di colore rosso scuro, marrone-rosso e grigio invece di **ROSA-ROSSA**). Bande con colori diversi dal **ROSA-ROSSA** possono indicare il deterioramento del reagente, errori procedurali o la presenza di sostanze interferenti.

Se un qualsiasi risultato è **NON VALIDO** o difficile da interpretare, il test deve essere ripetuto su una nuova preparazione dello stesso campione (utilizzare una nuova fiala di diluente per campioni). Se il campione originale produce ripetutamente risultati illeggibili, ripetere il test utilizzando un nuovo campione.

IMPORTANTE:

Una bassa percentuale di campioni può risultare **negativa per l'antigene GDH ma positiva per una o entrambe le tossine**. In questi casi, il test deve essere considerato **"non refertabile"** e va ripetuto dopo una nuova preparazione del campione di feci originale (vedere sopra).

Se il risultato non cambia, il test deve essere ripetuto su un nuovo campione di feci oppure andrà valutato l'uso di un test diagnostico aggiuntivo alternativo, come un test NAAT per il rilevamento dei geni Tox A/Tox B sul campione originale.

CONTROLLO QUALITÀ

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

Al momento di ogni utilizzo, i componenti del kit devono essere esaminati visivamente per determinare se sono presenti segni evidenti di contaminazione microbica, congelamento, perdite o altri danni.

CONTROLLI INTERNI: i controlli interni sono contenuti all'interno della striscia reattiva e quindi vengono eseguiti con ciascun test.

- Le bande **BLU** che appaiono nelle posizioni della linea del controllo servono come controllo procedurale e indicano che il test è stato eseguito correttamente, si è verificato un flusso corretto e i reagenti del test erano attivi al momento dell'uso.
- Uno sfondo pulito attorno alle linee del controllo e del test funge anche da controllo procedurale. Le linee del controllo o del test che risultano oscurate da un colore di fondo molto forte possono invalidare il test e possono essere un'indicazione di deterioramento del reagente, uso di un campione inappropriato o prestazioni inadeguate del test.

CONTROLLI ESTERNI: per ogni nuovo lotto del kit o nuova spedizione, si raccomanda di eseguire i controlli positivi e negativi esterni. Il numero di test eseguiti con i controlli esterni sarà determinato in base ai requisiti delle normative locali, statali e nazionali o in base ai requisiti di accreditamento. I controlli esterni vengono utilizzati per monitorare la reattività dei reagenti e le prestazioni dei test. Se i controlli non producono i risultati attesi, significa che uno dei reagenti o componenti non era più reattivo al momento dell'uso, che il test non è stato eseguito correttamente o che non sono stati aggiunti i reagenti o i campioni.

I risultati attesi dei controlli sono descritti nella sezione **INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**. 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 i test di controllo non producono i risultati corretti, il kit non deve essere utilizzato.

VALORI ATTESI

La frequenza della diarrea associata agli antibiotici causata da *C. difficile* dipende da diversi fattori, tra cui la popolazione dei pazienti, il tipo di istituto e l'epidemiologia. L'incidenza riportata di malattie associate a *C. difficile* in pazienti con sospetti di patologie associate agli antibiotici è del 15-20%, sebbene strutture diverse possano riscontrare tassi positivi al di sopra o al di sotto di questo intervallo.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Il test ha lo scopo di confermare la presenza dell'antigene comune GDH e delle tossine nelle feci del paziente. Un risultato negativo del test non preclude completamente l'infezione di un ceppo *C. difficile* tossigenico. I risultati del test devono essere utilizzati insieme alle informazioni ottenute dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.
- Il test è qualitativo e, nel riportare il risultato, non deve essere fornita alcuna interpretazione quantitativa rispetto all'intensità della linea positiva.
- Il test è destinato all'uso su feci umane senza conservanti; non sono stati validati altri tipi di campioni.
- La corretta conservazione delle feci è essenziale per ottenere risultati affidabili. La degradazione del campione può determinare risultati falsi negativi. Sebbene siano relativamente stabili a 2-8 C, le tossine di *C. difficile*, in particolare a basse concentrazioni, si degradano facilmente a temperatura ambiente. La velocità con cui le tossine si degradano differisce da campione a campione e pertanto non può essere prevista. Per questo motivo, le migliori pratiche richiedono che i campioni vengano refrigerati o congelati entro due ore dalla raccolta e analizzati entro i tempi raccomandati in queste istruzioni. Non accettare campioni che non siano stati raccolti, gestiti o trasportati correttamente.
- Sono stati identificati due gruppi distinti in grado di ospitare il *C. difficile* in modo asintomatico in percentuali molto elevate. Sono stati segnalati tassi di colonizzazione fino al 50% e oltre nei neonati e fino al 32% nei pazienti con fibrosi cistica.
- Se non viene aggiunta la giusta quantità di feci al flacone di Diluente del Campione, si possono ottenere risultati falsamente negativi o falsamente positivi.
- Un'incubazione eccessiva dei test può portare a risultati falsamente positivi. L'incubazione dei test a temperature o tempi ridotti può portare a risultati falsamente negativi.
- Campioni altamente emorragici possono interferire con il dosaggio determinando un risultato falsamente negativo o la comparsa di bande aspecifiche. Questo evento è spesso accompagnato dall'alterazione del colore delle bande. Non riportare alcun risultato se le bande non sono del colore corretto: le linee del controllo devono essere **BLU**, le linee del test devono essere **ROSA-ROSSE** (fare riferimento alla Fig. 1).
- Le linee guida internazionali raccomandano di evitare test ripetuti e test di cura con qualsiasi tipo di test per *C. difficile*, perché i pazienti possono eliminare spore, DNA e/o tossine di *C. difficile* per un periodo di tempo prolungato dopo la risoluzione della diarrea o la guarigione clinica. Per questo motivo, non è possibile stabilire le prestazioni del test per verificare l'efficacia dell'eradicazione (test di cura).

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Prestazioni cliniche di Immunocard STAT1 Il test *C. difficile* GDH-AB è stato valutato su un totale di 304 campioni per GDH e 180 campioni per le tossine A e B. I campioni sono stati prelevati in modo retrospettivo e conservati congelati. Sono state eseguite due valutazioni indipendenti: una nei laboratori del produttore e una presso un laboratorio clinico esterno indipendente.

I campioni sono stati caratterizzati utilizzando test immunologici commerciali per GDH e per le tossine A e B. I risultati discrepanti sono stati risolti con test aggiuntivi, tra cui il metodo di riferimento CCTNA (test di citotossicità e neutralizzazione cellulare).

La concordanza positiva viene utilizzata per valutare la sensibilità del test Immunocard STAT1 *C. difficile* GDH-AB, mentre la concordanza negativa viene utilizzata per valutare la sua specificità.

Di seguito sono riportati i risultati del confronto:

TABELLA 1 - Valutazione interna del produttore

| Immunocard STAT1 <i>C. difficile</i> GDH-AB Analisi GDH | CONFRONTO: ELISA C. DIFF CHECK – 60 | | |
|--|--|-------------|-------------|
| | POS | NEG | TOTALE |
| POSITIVO | 53 | 0 | 53 |
| NEGATIVO | 0 | 87 | 87 |
| Totale | 53 | 87 | 140 |
| | | % | IC 95% |
| Concordanza positiva (sensibilità clinica) | 53/53 | 100 | 93,2 – 100 |
| Concordanza negativa (specificità clinica) | 87/87 | 100 | 95,7 – 100 |
| Immunocard STAT1 <i>C. difficile</i> GDH-AB Analisi TOXINS | CONFRONTO: ELISA PROSPECT | | |
| | POS | NEG | TOTALE |
| POSITIVO | 45 | 0 | 45 |
| NEGATIVO | 6* | 85 | 91 |
| Totale | 51 | 85 | 136 |
| | | % | IC 95% |
| Concordanza positiva (sensibilità clinica) | 45/51 | 88,2 | 76,6 – 94,5 |
| Concordanza negativa (specificità clinica) | 85/85 | 100 | 95,6 – 100 |

*RISULTATI POSITIVI confermati mediante CCTNA (test di citotossicità e neutralizzazione cellulare)

TABELLA 2 - Valutazione di laboratorio indipendente

| Immunocard STAT1 C.difficile GDH-AB Analisi GDH | CONFRONTO: C. DIFF QUIK CHECK* | | |
|--|--|-------------|-------------|
| | POS | NEG | TOTALE |
| POSITIVO | 42 | 1** | 43 |
| NEGATIVO | 4* | 117 | 121 |
| Totale | 46 | 118 | 164 |
| | | % | IC 95% |
| Concordanza positiva (sensibilità clinica) | 42/46 | 91,3 | 79,7 – 96,6 |
| Concordanza negativa (specificità clinica) | 117/118 | 99,2 | 95,4 – 99,8 |
| Immunocard STAT1 C.difficile GDH-AB Analisi TOXINS | CONFRONTO: C. DIFF QUIK CHECK* COMPLETE | | |
| | POS | NEG | TOTALE |
| POSITIVO | 19 | 0 | 19 |
| NEGATIVO | 5*** | 20 | 25 |
| Totale | 24 | 20 | 44 |
| | | % | IC 95% |
| Concordanza positiva (sensibilità clinica) | 19/24 | 79,2 | 59,5 – 90,7 |
| Concordanza negativa (specificità clinica) | 20/20 | 100 | 83,9 – 100 |

RISOLUZIONE DEI RISULTATI DISCREPANTI

I campioni discrepanti sono stati analizzati utilizzando Techlab ELISA C. DIFF CHECKTM 60.

*Dei 4 campioni Immunocard STAT GDH NEG/COMPARATOR POS, 2 sono stati risolti come NEGATIVI, 1 è stato confermato come POSITIVO.

**Immunocard STAT GDH POS/COMPARATOR NEG è stato risolto come NEGATIVO.

***Dei 5 campioni Immunocard STAT TOXINS NEG/COMPARATOR POS, 2 sono stati risolti come NEGATIVI con il terzo test (ELISA), 2 hanno mostrato una concentrazione di tossina prossima al LoD del test, 1 era POSITIVO.

SENSIBILITÀ ANALITICA

Il limite di rilevabilità del test (LoD) è stato determinato come segue:

- Test GDH: per determinare il valore LoD sono state utilizzate diluizioni seriali di glutammato deidrogenasi di C. difficile da TCG BIOMICS. È stato ottenuto un valore medio di **0,195 ng/mL**.
- Test TOX A&B: per determinare il valore LoD sono state utilizzate diluizioni seriali delle tossine A e B da TCG BIOMICS. Sono stati ottenuti un valore medio di **1,56 ng/mL** per la tossina A e un valore medio di **0,75 ng/mL** per la tossina B.

RIPRODUCIBILITÀ

PRECISIONE INTER-GIORNALIERA

Utilizzando lo stesso lotto del test Simple GDH-Toxins, è stata misurata una curva di sensibilità e campioni reali sono stati definiti come NC (« campione negativo »), LPC (« campione debolmente positivo ») e PC (« campione positivo ») per ciascun analita, in triplicato, in un periodo di cinque giorni intervallati nel tempo. I risultati sono stati altamente riproducibili con differenze massime di ½ diluizione.

PRECISIONE INTER-OPERATORE

In triplicato, tre operatori hanno misurato una curva di sensibilità per ciascun analita e campioni reali sono stati definiti come NC (« campione negativo »), LPC (« campione debolmente positivo ») e PC (« campione positivo ») per ciascun analita. In nessuno dei casi le differenze osservate superavano la ½ diluizione con lo standard e gli stessi risultati sono stati ottenuti con i campioni reali.

PRECISIONE INTER-LOTTO

Tre diversi lotti del test Simple GDH-Toxins sono stati valutati in parallelo analizzando le curve di sensibilità e campioni reali sono stati definiti come NC (« campione negativo »), LPC (« campione debolmente positivo ») e PC (« campione positivo ») per ciascun analita. L'analisi è stata eseguita da una sola persona nello stesso giorno. Le differenze massime sono state inferiori o uguali a ½ diluizione con lo standard e gli stessi risultati sono stati ottenuti con i campioni reali, a dimostrazione dell'elevata precisione inter-lotto del test.

Le differenze riscontrate nelle sezioni "Riproducibilità" sono accettabili per una tecnica immunocromatografica qualitativa con la sua variabilità intrinseca.

EFFETTO PROZONA/HOOK

Sono state analizzate concentrazioni molto elevate dei tre analiti rilevati dal test senza osservare alcuna diminuzione nell'intensità dei segnali positivi. I valori di concentrazione (superiori ai valori massimi che possono essere riscontrati nella popolazione) sono i seguenti:

- GDH: 6000 ng/mL, circa 30000 volte il valore LoD del test.
- Tossina A: 3000 ng/mL, circa 1900 volte il valore LoD del test.
- Tossina B: 3000 ng/mL, circa 4000 volte il valore LoD del test.

SOSTANZE INTERFERENTI

Le sostanze indicate di seguito alla concentrazione specificata non hanno interferito con i risultati del test quando aggiunte a campioni di feci (positivi e negativi):

| | |
|--------------------------|-----------------------------------|
| Sangue intero 20% (v/v) | Ibuprofene 1,41 mg/mL |
| Vancomicina 1,17 mg/mL | Loperamide 9,38 µg/mL |
| Metronidazolo 1,17 mg/mL | Acido acetilsalicilico 2,34 mg/mL |
| Pepto-Bismol 1% (v/v) | Solfato di bario 4,4 mg/mL |
| Omeprazolo 11,7 µg/mL | Mucina 5% (p/p) |
| Cimetidina 7,38 mg/mL | Acido stearico-palmitico (1:1) |
| Paracetamolo 2,34 mg/mL | |

CROSS-REATTIVITÀ

È stata valutata la reattività crociata del test per diversi batteri che possono essere presenti nel tratto intestinale. Sono state eseguite due valutazioni indipendenti: una nei laboratori del produttore e una presso un laboratorio clinico esterno indipendente.

Valutazione interna del produttore

Il test non ha presentato reattività crociata con nessuna delle sospensioni batteriche elencate di seguito:

| | |
|---------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 0,25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Salmonella</i> spp. | 0,25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Campylobacter coli</i> | 0,25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | 0,25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 0,25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | 1,56 x 10 ⁵ (CFU/mL) |
| <i>Giardia lamblia</i> (trophozoites) | 5,5 x 10 ⁵ (cellule/mL) |
| <i>Giardia lamblia</i> (cysts) | 1,7 x 10 ⁵ (cellule/mL) |

Il test è stato valutato rispetto a campioni di feci fortemente positivi per i seguenti microrganismi senza alcuna reattività crociata osservata:

Adenovirus, Rotavirus, Norovirus GII, Astrovirus, *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*.

È stata registrata una reazione crociata con un campione di feci fortemente positivo per *Entamoeba histolytica* (un risultato debolmente positivo per Tossina B). Tuttavia, ulteriori test aggiuntivi non hanno confermato la reazione crociata.

Valutazione di un laboratorio esterno indipendente

Campioni di feci inoculati con i seguenti agenti microbici (fino a una concentrazione finale del campione di ~ 1 x 10⁸ organismi/mL)

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus* spp., *Bacteroides nordii*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 2, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus gossesi*, *Listeria monocitogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexnerii*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

NESSUNO degli organismi elencati ha mostrato reattività crociata con il test.

INFORMAZIONI E ASSISTENZA

Per qualsiasi richiesta tecnica o segnalazione, contattare l'Assistenza tecnica Meridian Bioscience al numero +390331433636 – e-mail: TS@meridianbioscience.com oppure rivolgersi al distributore nazionale (www.meridianbioscience.com/diagnostics/distributors/)

immunocard STAT!

C. difficile GDH-AB

Immuno-essai rapide en une étape pour la détection simultanée de l'antigène glutamate déshydrogénase (GDH) de *Clostridium difficile* et des toxines A et B dans les selles humaines

REF 750520

IVD

BUT DE LA METHODE

L'immunocard STAT! C. difficile GDH-AB est un test immunochromatographique qualitatif rapide permettant la détection simultanée dans les selles humaines de l'antigène glutamate déshydrogénase (GDH, également appelé « antigène commun ») du *Clostridium difficile*, et des toxines A et B du *Clostridium difficile*. Ce test s'utilise comme aide au diagnostic de maladies associées au C. difficile et les résultats doivent être utilisés par le clinicien en conjonction avec l'aspect clinique, d'autres résultats de laboratoire et les facteurs de risque épidémiologiques.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Clostridium difficile est une bactérie sporulée anaérobie à Gram positif qui peut être présente de manière asymptomatique chez près de 5 % de la population saine¹. Des souches toxigènes du *Clostridium difficile* sont la cause principale de la diarrhée infectieuse nosocomiale dans les pays développés, et sont également l'agent étiologique d'environ 25 % de tous les cas de diarrhée associés aux antibiotiques². Le nombre de cas d'infection à C. difficile (ICD) est estimé à 300 000 par an dans les hôpitaux des Etats-Unis seulement.^{1,2} Presque n'importe quel antibiotique peut prédisposer un patient à une ICD. L'aspect clinique pour l'ICD va de la colonisation asymptomatique jusqu'aux maladies potentiellement mortelles que sont la colite pseudomembraneuse et le mégacolon toxique.² Les souches pathogènes de C. difficile produisent au moins une des deux toxines suivantes, qui diffèrent du point de vue biologique et immunologique³: la toxine A (entérotoxine) et la toxine B (cytoxine), qui sont les principaux facteurs de virulence responsables des signes cliniques de la maladie.

La glutamate déshydrogénase (GDH), est une enzyme produite en grandes quantités par les souches toxigènes et non toxigènes de C. difficile, ce qui en fait un excellent marqueur pour déterminer la présence de ce microorganisme⁴.

La Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), l'Infectious Diseases Society of America (IDSA) et la Société européenne de microbiologie clinique et des maladies infectieuses (ESCMID) recommandent différentes approches de test pour la détection en laboratoire du C. difficile toxigène⁵, y compris différentes combinaisons de tests de la GDH, des toxines et de TAAN. Un des algorithmes de test suggérés consiste à suivre un protocole en deux étapes impliquant un dépistage initial de l'échantillon avec un test de la GDH puis, si le résultat est positif, un second test pour confirmer la toxigénicité de la souche, car seules les souches toxigènes et pathologiques de ce microorganisme produisent les toxines. Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB permet à un laboratoire d'adopter cette approche en obtenant les deux résultats simultanément grâce à un test en une seule étape.

Un résultat positif du test pour la glutamate déshydrogénase de C. difficile confirme la présence de cet organisme dans un échantillon fécal ; un résultat négatif indique l'absence de l'organisme. Un résultat positif au test pour les toxines A et/ou B confirme la présence de C. difficile toxigène.

PRINCIPE DU TEST

Le test Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB contient deux bandelettes placées dans une double cassette, une pour la GDH et une pour les toxines A et B :

1. La bandelette GDH utilise la combinaison suivante :
 - a. Particules de latex roses-rouges conjuguées à des anticorps spécifiques agissant contre la GDH de C. difficile et anticorps spécifiques à la GDH immobilisés dans la position de test, en-dessous de la ligne de contrôle. Pendant l'incubation, si l'antigène GDH est présent, il se lie à ces deux anticorps, développant une ligne rose-rouge sur la position de test.
 - b. Particules de latex bleues conjuguées à un antigène reconnu par un anticorps spécifique à cet antigène, lié à la membrane, définissant la ligne de contrôle du test.
2. La bandelette des TOXINES utilise la combinaison suivante :
 - a. Particules de latex roses-rouges conjuguées à des anticorps spécifiques agissant contre la toxine B et anticorps spécifiques à la toxine B immobilisés en position B, en-dessous de la ligne de contrôle. Pendant l'incubation, si la toxine B est présente, elle se lie à ces deux anticorps, développant une ligne rose-rouge sur la position B.
 - b. Particules de latex roses-rouges conjuguées à des anticorps spécifiques agissant contre la toxine A et anticorps spécifiques à la toxine A immobilisés en position A, en-dessous de la ligne de toxine B. Pendant l'incubation, si la toxine A est présente, elle se lie à ces deux anticorps, développant une ligne rose-rouge sur la position A.
 - c. Particules de latex bleues conjuguées à un antigène reconnu par un anticorps spécifique à cet antigène, lié à la membrane, définissant la ligne de contrôle du test.

Un échantillon dilué des selles d'un patient est dispensé dans les deux orifices pour échantillon de la cassette et migre le long des membranes au travers des zones de test et de contrôle. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, l'apparition d'une ligne d'une couleur spécifique dans la fenêtre de lecture à côté de la lettre correspondante indique un résultat positif en présence de la ligne de contrôle (voir Fig. 1).

MATERIEL FOURNI

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

1. Dispositif Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB : Deux bandelettes réactives dans un cadre en plastique et emballées dans une pochette en aluminium avec un dessiccant.
2. Flacons de diluant d'échantillon : Solution tamponnée contenant 0,095 % d'azide de sodium comme agent conservateur. Le diluant est fourni dans un flacon compte-goutte en plastique à usage unique avec une tige d'application. Utiliser le produit fourni.
3. Pipettes de transfert jetables

MATERIEL NON FOURNI

1. Kit de contrôle externe avec contrôles positif et négatif. Catalogue Meridian 750501
2. Vortex
3. Minuteur

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro. Réservé à un usage professionnel.
2. Ne pas dévier de la méthode décrite ici sous peine de résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Une fois que le test a démarré, exécuter les étapes subséquentes sans interruption.
3. L'échantillon du patient et le dispositif Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB utilisé peuvent contenir des agents infectieux et doivent être manipulés conformément au niveau de biosécurité 2, comme recommandé dans le manuel de sécurité biologique en laboratoire du CDC/NIH.
4. Ne pas interchanger les réactifs de différents numéros de lot de kit et ne pas utiliser de réactifs ayant dépassé leur date d'expiration.
5. Ne pas utiliser le tampon de dilution d'échantillon en cas d'évidence de contamination ou de trouble.
6. Le tampon de dilution d'échantillon contient de l'azide de sodium qui est irritant pour la peau. Éviter tout contact des réactifs avec la peau. L'élimination de réactifs contenant de l'azide de sodium dans des tuyauteries en plomb ou en cuivre peut provoquer la formation d'azides de métal explosifs. Cela peut être évité en rinçant avec un grand volume d'eau pendant cette élimination.
7. La conservation et la dilution correctes des selles sont essentielles pour garantir des résultats corrects. Une inoculation trop importante de selles dans le diluant d'échantillon peut inhiber le flux dans le dispositif Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB et provoquer des résultats non valides. Une conservation incorrecte des selles ou une sous-inoculation dans le diluant d'échantillon peuvent provoquer des résultats faussement négatifs.
8. Si l'emballage primaire est endommagé (pochette en aluminium ou flacon de tampon diluant), le produit doit être mis au rebut et ne doit pas être utilisé.
9. Ne pas utiliser ce produit si une ligne de couleur apparaît dans la zone des résultats de n'importe quelle bandelette avant de commencer à l'utiliser.
10. Si le coffret de tests est conservé par réfrigération, laisser les composants du coffret et les échantillons fécaux atteindre la température ambiante, car la basse température des réactifs et/ou des échantillons peut réduire la fonctionnalité du test.
11. Ne pas jeter la boîte du kit tant que l'ensemble de son contenu n'a pas été utilisé. Cette boîte contient des informations essentielles sur la marque CE du produit et le numéro de lot.
12. Le produit usagé doit être mis au rebut conformément aux lois locales en vigueur.

DANGER ET MISES EN GARDE

A notre connaissance, il n'y a pas de risque connu associé à ce produit.

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

Conserver le kit Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB entre 2 et 30 C quand il n'est pas utilisé. La date d'expiration du kit figure sur l'étiquette du kit.

REMARQUES SUR LA PROCEDURE

1. Laisser les composants du kit et les échantillons atteindre la température ambiante (entre 19 et 27 C) avant d'effectuer un test, car une basse température des réactifs et/ou des échantillons peut diminuer la sensibilité du test. Les réactifs peuvent prendre jusqu'à 60 minutes pour se réchauffer après une réfrigération.
2. Les échantillons de selles doivent être mélangés soigneusement (quelle que soit leur consistance) avant l'échantillonnage pour garantir l'obtention d'un échantillon représentatif.
3. Tenir le flacon de réactif à la verticale lors de la distribution pour assurer que les gouttes ont une taille correcte et qu'elles sont distribuées régulièrement.
4. Il peut arriver que les particules de selles inhibent le flux de l'échantillon. Lorsque le dispositif de test n'absorbe pas facilement l'échantillon dilué, toucher délicatement le fond de la fenêtre échantillon avec un bâtonnet applicateur pour bouger les particules solides de selles qui empêchent l'absorption. Alternativement, on peut prendre une nouvelle aliquote d'échantillon à partir du diluant et tester à nouveau. Les échantillons dilués contenant une concentration importante de particules peuvent être centrifugés (1 à 5 minutes à 700 x G) ou laissés à décanter pendant 3 à 5 minutes avant de continuer.
5. Veiller à ajouter la quantité d'échantillon adéquate (environ 110 mg de selles) dans le flacon de dilution de l'échantillon. Si l'échantillon est semi-liquide (difficile à dispenser avec une pipette) prendre une petite portion de selles d'environ 5 mm de diamètre (quantité adéquate pour couvrir les rainures de la tige du capuchon de diluant d'échantillon). Si l'échantillon est liquide, ajouter 110 µl dans le flacon de diluant d'échantillon (4 gouttes si les pipettes jetables fournies avec le kit sont utilisées). Ne tester aucun échantillon, quel qu'il soit, sans sa dilution adéquate dans le diluant d'échantillon.
6. Veiller à ajouter le volume correct de l'échantillon extrait dans les deux orifices pour échantillon marqués d'une flèche dans le dispositif en plastique. Si le volume est inférieur à ce qui est indiqué, le flux peut ne pas se produire en raison de la quantité insuffisante d'échantillon qui atteint les zones réactives ; si le volume est plus grand, des lignes marrons peuvent apparaître au lieu des lignes attendues (voir Fig. 1).

PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs sont fournis prêts à l'emploi. Laisser les composants du kit et les échantillons atteindre la température ambiante (entre 19 et 27 C) avant de les utiliser. Mélanger doucement les réactifs liquides avant l'utilisation. Ouvrir la pochette du dispositif seulement quand vous êtes prêt à réaliser le test.

PRELEVEMENT ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS

Le test a été validé pour des échantillons frais non traités. Ne pas utiliser d'échantillons recueillis dans des milieux de transport, ni ceux possédant des agents conservateurs ajoutés (formol, SAF, PVA ou similaire) ou des milieux d'enrichissement, car leur présence pourrait interférer avec les performances correctes du test.

Les échantillons de selles doivent être transportés dans un récipient hermétique. L'échantillon doit être testé dès que possible, mais peut être conservé entre 2 et 8 C pendant 2 jours maximum avant d'être testé. Si le test ne peut pas être réalisé dans cette période de temps, les échantillons doivent être congelés immédiatement au moment de leur réception et conservés congelés (-20 C) jusqu'au test. Les échantillons peuvent être congelés et décongelés deux fois. Veiller à ce que les échantillons aient atteint la température ambiante avant de tester.

PROCEDURE DE TEST

Amener les cartes de test, les diluants d'échantillon et les échantillons à température ambiante (entre 19 et 27 C) avant de tester. Sortir les réactifs de la boîte du kit pour les réchauffer. Les réactifs peuvent prendre jusqu'à 60 minutes pour se réchauffer après une réfrigération.

1. Etiqueter un flacon de diluant d'échantillon pour chaque échantillon de patient à tester.
2. Dévisser le capuchon du flacon avec soin afin de ne pas renverser le tampon diluant d'échantillon.
3. Ajouter immédiatement l'échantillon de selles ou les contrôles comme suit:
 - a. Selles formées/solides – Mélanger l'échantillon de selles minutieusement. A l'aide de la tige fixée au capuchon du flacon, recueillir une petite portion de 5 mm de diamètre.
 - b. Selles semi-solides - Mélanger l'échantillon de selles minutieusement. A l'aide de la tige attachée au capuchon du flacon, recueillir une quantité d'échantillon qui couvre complètement les rainures de la tige.
 - c. Selles liquides - A l'aide des pipettes jetables fournies dans le kit, mélanger l'échantillon de selles minutieusement, recueillir et mettre

dans le flacon 4 gouttes de selles (correspondant à un volume de 110 µL).

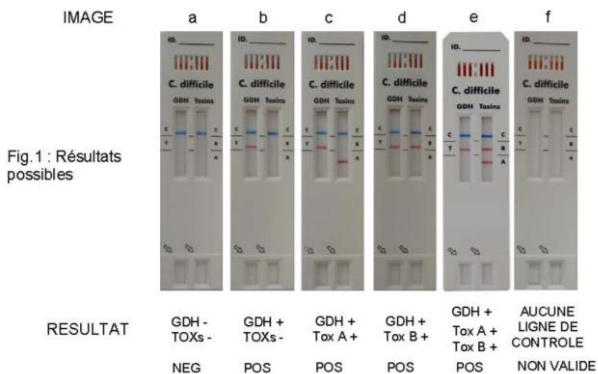
d. Contrôle externe positif ou négatif : reportez-vous au mode d'emploi du KIT DE CONTROLE EXTERNE.

- Ajouter avec soin l'échantillon dans le flacon correspondant contenant le tampon de dilution. Visser le capuchon fermement et le secouer vigoureusement pour assurer l'homogénéité du mélange.
- Utiliser 1 carte de test immunocard STAT! pour chaque échantillon ou contrôle. Une fois prêt à réaliser le test, enlever la carte de test de sa pochette en aluminium. Jeter la pochette et le dessiccant. Etiqueter le dispositif en mettant le nom du patient ou le contrôle.
- Casser le haut du capuchon du flacon en utilisant un morceau de papier pour empêcher les fuites.
- Retourner le flacon et, en le maintenant en position verticale, ajouter 4 gouttes d'échantillon dilué dans l'orifice d'échantillonnage de chaque bandelette (fenêtres rectangulaires marquées d'une flèche).
- Incuber la carte de test entre 19 et 27 C pendant 15 minutes.
- Lire les résultats de chaque carte dans les 30 secondes suivant la fin de l'incubation.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La cassette contient deux bandelettes : à gauche la bandelette pour la GDH, à droite la bandelette pour les toxines A et B.

Les résultats possibles sont illustrés dans la Fig. 1.



RESULTATS NEGATIFS : Une ligne **BLEUE** à la position de la ligne de contrôle (C). Aucune autre ligne n'est présente dans les deux bandelettes de la cassette.

Un résultat négatif dans la bandelette de l'antigène GDH indique que l'antigène *C. difficile* est soit absent de l'échantillon, soit en dessous de la limite de détection du test.

Un résultat négatif dans la bandelette des toxines indique soit que les toxines de *C. difficile* sont absentes de l'échantillon, soit qu'elles sont en dessous de la limite de détection du test.

RESULTATS POSITIFS POUR GDH : Une ligne **ROSE-ROUGE** à la position TEST (T), en présence d'une ligne **BLEUE** à la position de la ligne de contrôle (C) dans la BANDELETTE GAUCHE de la cassette. Un résultat positif indique la présence de *C. difficile* dans l'échantillon.

RESULTATS POSITIFS POUR LES TOXINES : Une ligne **ROSE-ROUGE** à la position TOXINE A (A) et/ou TOXINE B (B), en présence d'une ligne **BLEUE** à la position de la ligne de contrôle (C) dans la BANDELETTE DROITE de la cassette. Un résultat positif indique la présence de toxine(s) de *C. difficile*.

Effectuer la lecture immédiatement à la fin de la période d'incubation. Si une bande **ROSE-ROUGE** apparaît au niveau de la position de la ligne de test GDH, toxine A ou toxine B du dispositif après une durée d'incubation prolongée, ce résultat ne doit pas être rapporté comme étant positif.

RESULTATS NON VALIDES :

Le test sera considéré non valide et les résultats ne peuvent pas être rapportés dans les cas suivants :

- AUCUNE LIGNE DE CONTRÔLE (**BLEUE**) n'apparaît à la position désignée pour la ligne de contrôle (C). Le test n'est pas valide, car l'absence d'une ligne de contrôle indique que la procédure de test a été mal réalisée ou que les réactifs ont été détériorés.
- Présence d'au moins une ligne de la MAUVAISE COULEUR (par exemple : lignes rouge foncé, marron-rouge et grises au lieu de **ROSE-ROUGE**). Des bandes d'une couleur autre que **ROSE-ROUGE** peuvent indiquer une détérioration du réactif, des erreurs de procédure ou la présence de substances interférentes.

Si un résultat n'est PAS VALIDE ou difficile à interpréter, le test doit être répété sur une nouvelle préparation avec le même échantillon (utiliser un nouveau flacon de diluant d'échantillon). Si l'échantillon original produit à plusieurs reprises des résultats illisibles, se procurer un nouvel échantillon et tester de nouveau.

CONSEIL IMPORTANT :

Un faible pourcentage d'échantillons peut donner un résultat **négatif à l'antigène GDH mais positif à une ou aux deux toxines**. Si tel est le cas, le test doit être considéré comme « non exploitable » et doit être répété après une nouvelle préparation avec l'échantillon de selles d'origine (voir ci-dessus).

Si le résultat ne change pas, répéter le test sur un échantillon de selles nouvellement procuré ou considérer l'utilisation d'un test de diagnostic supplémentaire, tel qu'un test TAAN pour la détection des gènes de la Tox A/Tox B sur l'échantillon d'origine.

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, les composants du kit doivent être examinés visuellement pour détecter toute trace évidente de contamination microbienne, de congélation, de fuite ou de dommages.

CONTROLES INTERNES : Les contrôles internes sont contenus à l'intérieur de la bandelette de test et sont donc évalués avec chaque test.

- Les lignes **BLEUES** qui apparaissent aux positions de la ligne de contrôle servent à contrôler la procédure et indiquent que le test a été réalisé correctement, qu'un écoulement correct s'est produit et que les réactifs de test étaient actifs au moment de leur utilisation.
- Un arrière-plan propre autour des lignes de contrôle et de test sert aussi à contrôler la procédure. Des lignes de contrôle ou de test qui sont obscurcies par une couleur d'arrière-plan sombre peuvent rendre le test non valide et peuvent indiquer la détérioration du réactif, l'utilisation d'un échantillon non approprié ou des performances incorrectes du test.

CONTROLES EXTERNES : Les contrôles externes positifs et négatifs doivent être testés avec chaque nouveau lot de kits ou chaque nouveau lot reçu. Le nombre de tests réalisés avec les contrôles externes sera déterminé par les exigences des réglementations locales ou nationales ou des agences d'accréditation. Les contrôles externes s'utilisent pour surveiller la réactivité des réactifs et les performances du test. Si les contrôles ne produisent pas les résultats attendus, cela peut signifier qu'un des réactifs ou un des composants n'est plus réactif au moment de l'utilisation, que le test n'a pas été réalisé correctement ou que des réactifs ou les échantillons n'ont pas été ajoutés.

Les résultats attendus avec les contrôles sont décrits dans la section INTERPRETATION DES RESULTATS. 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. Le kit ne doit pas être utilisé si les tests de contrôle ne produisent pas les résultats corrects.

VALEURS ATTENDUES

La fréquence des diarrhées associées aux antibiotiques provoquée par le *C. difficile* dépend de plusieurs facteurs, y compris la population de patients, le type d'établissement et l'épidémiologie. L'incidence rapportée de maladies associées au *C. difficile* chez les patients qui sont soupçonnés de souffrir de maladies associées aux antibiotiques est de 15 à 20 %, bien que les taux positifs peuvent être supérieurs ou inférieurs à cette plage selon l'établissement.

LIMITES DU TEST

1. Le test a été conçu pour confirmer la présence de l'antigène commun et des toxines de la GDH dans les selles d'un patient. Un résultat de test négatif n'exclut pas complètement une infection par une souche de *C. difficile* toxinogène. Les résultats de test doivent être utilisés en conjonction avec les informations disponibles fournies par l'évaluation clinique du patient et d'autres procédures de diagnostic.
2. Le test est qualitatif et aucune interprétation quantitative ne doit être déduite quant à l'intensité de la ligne positive lors du rendu du résultat.
3. Le test a été prévu pour être utilisé sur des selles humaines sans agents conservateurs ; aucun autre type d'échantillon n'a été validé.
4. Une conservation correcte des selles est essentielle pour des résultats fiables. La dégradation de l'échantillon peut entraîner des résultats faussement négatifs. Bien que relativement stables entre 2 et 8 C, les toxines de *C. difficile*, particulièrement à faible concentration, peuvent se dégrader facilement à température ambiante. La vitesse à laquelle les toxines se dégradent diffère d'un échantillon de patient à l'autre et ne peut donc pas être prédite. C'est pourquoi la meilleure pratique consiste à réfrigérer ou congeler les échantillons dans les deux heures suivant leur prélèvement et les tester dans les temps indiqués dans la présente notice. Ne pas accepter d'échantillons qui n'ont pas été prélevés, manipulés ou transportés correctement.
5. Deux groupes distincts ont été identifiés pouvant héberger *C. difficile* de façon asymptomatique à des niveaux très élevés. Des taux de colonisation jusqu'à 50 % et plus ont été trouvés chez des nourrissons et des taux jusqu'à 32 % chez des patients souffrant de fibrose kystique.
6. Si la quantité de selles ajoutée au flacon de diluant d'échantillon est incorrecte, les résultats obtenus peuvent être faussement positifs ou faussement négatifs.
7. Une durée trop longue d'incubation des tests peut provoquer des résultats de test faussement positifs. L'incubation des tests à une température réduite ou pendant une durée réduite peut provoquer des résultats faussement négatifs.
8. Il est possible que des échantillons hautement hémorragiques perturbent le test en donnant un résultat faussement négatif ou l'aspect de lignes aspécifiques. Cet événement est souvent accompagné de l'altération de la couleur des lignes. Ne pas enregistrer les résultats si les lignes ne sont pas de la couleur correcte (les lignes de contrôle doivent être **BLEUES**, les lignes de test doivent être **ROSES-ROUGES**). Se reporter à la Fig. 1.
9. Les directives internationales recommandent d'éviter toute répétition et tout test de contrôle de l'efficacité d'un traitement sur le test *C. difficile* car les patients peuvent excréter des spores, de l'ADN et/ou des toxines de *C. difficile* pendant une durée prolongée après la résolution de la diarrhée ou la guérison clinique. C'est pourquoi les performances du test ne peuvent pas être établies dans le but de vérifier l'efficacité de l'éradication (test de contrôle de l'efficacité d'un traitement).

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

Les performances cliniques d'ImmunoCard STAT! *C. difficile* GDH-AB ont été évaluées sur un total de 304 échantillons pour la GDH et de 180 échantillons pour les toxines A et B. Les échantillons ont été prélevés rétrospectivement et conservés congelés. Deux évaluations indépendantes ont été réalisées : une dans les laboratoires du fabricant, l'autre dans un laboratoire clinique indépendant externe.

Les échantillons ont été caractérisés à l'aide d'immuno-essais disponibles dans le commerce pour la GDH et pour les toxines A et B. Des résultats différents ont été résolus à l'aide de tests supplémentaires, notamment le test de référence standard de « cytotoxicité de cellule et neutralisation ». L'accord positif s'utilise pour évaluer la sensibilité du test ImmunoCard STAT! *C. difficile* GDH-AB, tandis que l'accord négatif s'utilise pour évaluer sa spécificité.

Résultats comparatifs ci-dessous :

TABLEAU 1 – Évaluation interne du fabricant

| Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB Test GDH | COMPARATEUR : ELISA C. DIFF CHECK – 60 | | |
|--|---|-------------|-------------|
| | POS | NEG | TOTAL |
| POSITIF | 53 | 0 | 53 |
| NÉGATIF | 0 | 87 | 87 |
| Total | 53 | 87 | 140 |
| | | % | IC 95% |
| Accord positif (sensibilité clinique) | 53/53 | 100 | 93,2 – 100 |
| Accord négatif (spécificité clinique) | 87/87 | 100 | 95,7 – 100 |
| Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB Test TOXINS | COMPARATEUR : ELISA PROSPECT | | |
| | POS | NEG | TOTAL |
| POSITIF | 45 | 0 | 45 |
| NÉGATIF | 6* | 85 | 91 |
| Total | 51 | 85 | 136 |
| | | % | IC 95% |
| Accord positif (sensibilité clinique) | 45/51 | 88,2 | 76,6 – 94,5 |
| Accord négatif (spécificité clinique) | 85/85 | 100 | 95,6 – 100 |

* RÉSULTATS POSITIFS confirmés par CCTNA (test de cytotoxicité de cellule et de neutralisation)

TABLEAU 2 – Évaluation du laboratoire indépendant

| Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB Test GDH | COMPARATEUR :: C. DIFF QUIK CHECK® | | |
|--|---|-------------|------------|
| | POS | NEG | TOTAL |
| POSITIF | 42 | 1** | 43 |
| NÉGATIF | 4* | 117 | 121 |
| Total | 46 | 118 | 164 |
| | | % | IC 95% |
| Accord positif (sensibilité clinique) | 42/46 | 91,3 | 79,7-96,6 |
| Accord négatif (spécificité clinique) | 117/118 | 99,2 | 95,4-99,8 |
| Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB Test TOXINS | COMPARATEUR : C. DIFF QUIK CHECK® COMPLETE | | |
| | POS | NEG | TOTAL |
| POSITIF | 19 | 0 | 19 |
| NÉGATIF | 5*** | 20 | 25 |
| Total | 24 | 20 | 44 |
| | | % | IC 95% |
| Accord positif (sensibilité clinique) | 19/24 | 79,2 | 59,5-90,7 |
| Accord négatif (spécificité clinique) | 20/20 | 100 | 83,9 - 100 |

RÉSOLUTION de RÉSULTATS DIFFÉRENTS

Les échantillons dont les résultats sont différents ont été analysés avec le test ELISA C. DIFF CHECK™ 60 de Techlab.

*Des 4 échantillons Immunocard STAT GDH NEG/COMPARATEUR POS, 2 ont été résolus comme étant NÉGATIFS, 1 a été confirmé POSITIF.

**Le test Immunocard STAT GDH POS/COMPARATEUR NEG a été résolu comme étant NÉGATIF.

***Des 5 tests Immunocard STAT TOXINES NEG/COMPARATEUR POS, 2 ont été résolus comme NÉGATIFS avec le troisième test (ELISA), 2 ont montré une concentration de toxines proche de la limite de détection (LoD) du test, 1 était POSITIF.

SENSIBILITE ANALYTIQUE

La limite de détection (LoD) du test a été déterminée comme suit :

- Test GDH : des dilutions en série de glutamate déshydrogénase de C. difficile de TGC BIOMIC ont été utilisées pour déterminer la valeur de la LoD. Une valeur moyenne de **0,195 ng/mL** a été obtenue.
- Test TOX A ET B : des dilutions en série de toxines A et B de TGC BIOMIC ont été utilisées pour déterminer la valeur de la LoD. Une valeur moyenne de **1,56 ng/mL** pour la toxine A et une valeur moyenne de **0,75 ng/mL** pour la toxine B ont été obtenues.

REPRODUCTIBILITE DU TEST

INTER-JOURS

En utilisant le même lot que le test GDH-Toxines simple, une courbe de sensibilité a été mesurée et des échantillons réels établis comme étant NC (« échantillon négatif »), LPC (« échantillon faiblement positif ») et PC (« échantillon positif ») pour chaque analyte, en double, sur une période de cinq jours espacés dans le temps. Les résultats ont été très reproductibles, obtenant des différences maximales de ½ dilution.

PRÉCISION INTER-OPÉRATEURS

En triple, trois opérateurs ont mesuré une courbe de sensibilité pour chaque analyte et des échantillons réels établis comme étant NC (« échantillon négatif »), LPC (« échantillon faiblement positif ») et PC (« échantillon positif ») pour chaque analyte. Les différences observées n'ont pas dépassé ½ dilution avec la référence dans aucun des cas, et les mêmes résultats ont été obtenus avec les échantillons réels.

PRÉCISION INTER-LOTS

Trois lots différents du test GDH-Toxines simple ont été évalués en parallèle en analysant les courbes de sensibilité et des échantillons réels établis comme étant NC (« échantillon négatif »), LPC (« échantillon faiblement positif ») et PC (« échantillon positif ») pour chaque analyte. L'analyse a été réalisée par une personne le même jour. Les différences maximales étaient inférieures ou égales à ½ dilution avec la référence, et les mêmes résultats ont été obtenus avec les échantillons réels, prouvant ainsi la haute précision inter-lots du test.

Les différences trouvées dans les sections « reproductibilité » sont acceptables pour une technique immunochromatographique qualitative avec sa variabilité inhérente.

EFFET PROZONE

Les très fortes concentrations des trois analytes détectées par le test ont été testées sans observer aucune diminution d'intensité des signaux positifs. Ces valeurs de concentration (plus élevées que les valeurs maximum qui peuvent être trouvées parmi la population) sont les suivantes :

- GDH : 6 000 ng/mL, environ 30 000 fois la LoD du test.
- Toxine A : 3 000 ng/mL, environ 1 900 fois la LoD du test.
- Toxine B : 3 000 ng/mL, environ 4000 fois la LoD du test.

SUBSTANCES INTERFERENTES

Les substances indiquées ci-dessous à la concentration spécifiée n'ont pas interféré avec les résultats du test quand elles ont été ajoutées à des échantillons de selles (positifs et négatifs) :

| | |
|--------------------------|------------------------------------|
| Sang total 20 % (V/V) | Ibuprofène 1,41 mg/mL |
| Vancomycine 1,17 mg/mL | Lopéramide 9,38 µg/mL |
| Métronidazole 1,17 mg/mL | Acide acétylsalicylique 2,34 mg/mL |
| Pepto-Bismol 1% (V/V) | Sulfate de baryum 4,4 mg/mL |
| Oméprazole 11,7 µg/mL | Mucine 5 % (M/M) |
| Cimétidine 7,38 mg/mL | Acide stéarique-palmitique (1:1) |
| Paracétamol 2,34 mg/mL | |

REACTIVITE CROISEES

La réactivité croisée du test a été évaluée pour différentes bactéries pouvant être présentes dans le tube digestif. Deux évaluations indépendantes ont été réalisées : une dans les laboratoires du fabricant, l'autre dans un laboratoire clinique indépendant externe.

Évaluation interne du fabricant

Le test n'a présenté aucune réactivité croisée avec aucune des suspensions bactériennes décrites ci-dessous :

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 0,25 x 10 ⁸ (UFC/mL) |
| <i>Salmonella spp.</i> | 0,25 x 10 ⁸ (UFC/mL) |
| <i>Campylobacter coli</i> | 0,25 x 10 ⁸ (UFC/mL) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | 0,25 x 10 ⁸ (UFC/mL) |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 0,25 x 10 ⁸ (UFC/mL) |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | 1,56 x 10 ⁵ (UFC/mL) |
| <i>Giardia lamblia (trophozoïtes)</i> | 5,5 x 10 ⁶ (cellules/mL) |
| <i>Giardia lamblia (kystes)</i> | 1,7 x 10 ⁶ (cellules/mL) |

Le test a été évalué sur des selles fortement positives pour les microorganismes suivants sans aucune réactivité croisée observée : Adenovirus, Rotavirus, Norovirus GII, Astrovirus, *Campylobacter spp.*, *Helicobacter pylori*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*.

Une réaction croisée avec un échantillon de selles fortement positif à l'*Entamoeba histolytica* a été enregistré (un résultat positif faible pour la Toxine B). Toutefois, d'autres tests supplémentaires n'ont pas confirmé la réaction croisée.

Évaluation d'un laboratoire externe indépendant

Des échantillons de selles inoculés avec les agents microbiens suivants (jusqu'à une concentration finale de l'échantillon de ~ 1 x 10⁸ organismes/mL)

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus spp.*, *Bacteroides nordii*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 2, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus gossesi*, *Listeria monocitogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

AUCUN des organismes décrits n'a produit de réaction croisée avec le test.

INFORMATIONS ET ASSISTANCE

Pour toute requête technique ou plainte, contactez l'assistance technique de Meridian Bioscience au +390331433636 – Courriel : TS@meridianbioscience.com ou appelez le distributeur de votre pays (www.meridianbioscience.com/diagnostics/distributors/)

immunocard STAT!®

C. difficile GDH-AB

Inmunoanálisis rápido de un solo paso para la detección simultánea del antígeno de la glutamato deshidrogenasa (GDH) y de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* en heces humanas

REF 750520

IVD

USO INDICADO

Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB es un ensayo inmunocromatográfico cualitativo rápido para la detección simultánea en heces humanas del antígeno de la glutamato deshidrogenasa (GDH) de *Clostridium difficile* –también llamado “antígeno común”– y de las toxinas A y B de *Clostridium difficile*. Este ensayo se utiliza como complemento para el diagnóstico de la enfermedad asociada a C. difficile, y el médico debe valorar los resultados junto con el cuadro clínico, otros hallazgos analíticos y los factores de riesgo epidemiológico.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Clostridium difficile es una bacteria anaerobia, grampositiva y formadora de esporas que puede estar presente de forma asintomática hasta en el 5 % de la población sana¹. Las cepas toxigénicas de *Clostridium difficile* son la principal causa de diarrea infecciosa hospitalaria en los países desarrollados, y también es el agente etiológico de aproximadamente el 25 % de todos los casos de diarrea postantibiótica². Según las estimaciones, solo en los hospitales de los Estados Unidos, hay 300 000 casos de infección por C. difficile (EACD, enfermedad asociada a *Clostridium difficile*) al año^{1,2}. Prácticamente cualquier antibiótico puede predisponer a un paciente a la EACD. El cuadro clínico de la EACD puede ir desde una colonización asintomática hasta una colitis pseudomembranosa potencialmente mortal y megacolon tóxico². Las cepas patógenas de C. difficile producen al menos una de dos toxinas distintas desde el punto de vista biológico e inmunológico³: la toxina A (enterotoxina) y la toxina B (citotoxina), que son los principales factores de virulencia responsables de los signos clínicos de la enfermedad.

La glutamato deshidrogenasa (GDH) es una enzima que producen en grandes cantidades las cepas toxigénicas y no toxigénicas de C. difficile, lo que la convierte en un excelente marcador para determinar la presencia de este microorganismo⁴.

La Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), la Infectious Diseases Society of America (IDSA) y la European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) recomiendan diferentes métodos de análisis para la detección en el laboratorio de cepas toxigénicas de C. difficile⁵, incluyendo diferentes combinaciones de ensayos de GDH, toxinas y PAAN. Uno de los algoritmos de análisis recomendados consiste en usar un protocolo de dos pasos, con un cribado inicial de la muestra mediante un análisis de GDH y, si el resultado es positivo, una segunda prueba para confirmar la toxigenicidad de la cepa, ya que solo producen toxinas las cepas toxigénicas y patológicas de este microorganismo. Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB permite a un laboratorio adoptar este enfoque, y obtener simultáneamente los dos resultados con un ensayo de un solo paso.

Un resultado positivo en la prueba de glutamato deshidrogenasa de C. difficile confirma la presencia de este organismo en una muestra fecal; un resultado negativo indica la ausencia del organismo. Un resultado positivo en la prueba de las toxinas A y/o B confirma la presencia de una cepa de C. difficile toxigénica.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

La prueba Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB contiene dos tiras dispuestas en un casete doble, una para GDH y otra para las toxinas A y B:

1. La tira de GDH utiliza una combinación de lo siguiente:
 - a. Partículas de látex de color rosado-rojo conjugadas con anticuerpos específicos para la GDH de C. difficile, y anticuerpos específicos para GDH inmovilizados en la posición analítica, debajo de la banda de control. Durante la incubación, si hay antígenos de GDH presentes, se unen a ambos anticuerpos, produciendo una línea rosada-roja en la posición analítica.
 - b. Partículas de látex de color azul conjugadas con un antígeno que reconoce un anticuerpo específico unido a la membrana, y que define la banda de control del análisis.
2. La tira de TOXINAS utiliza una combinación de lo siguiente:
 - a. Partículas de látex de color rosado-rojo conjugadas con anticuerpos específicos para la toxina B, y anticuerpos específicos para la toxina B inmovilizados en la posición B, debajo de la banda de control. Durante la incubación, si hay toxina B presente, se une a ambos anticuerpos, produciendo una línea rosada-roja en la posición B.
 - b. Partículas de látex de color rosado-rojo conjugadas con anticuerpos específicos para la toxina A, y anticuerpos específicos para la toxina A inmovilizados en la posición A, debajo de la banda de la toxina B. Durante la incubación, si hay toxina A presente, se une a ambos anticuerpos, produciendo una línea rosada-roja en la posición A.
 - c. Partículas de látex de color azul conjugadas con un antígeno que reconoce un anticuerpo específico unido a la membrana, y que define la banda de control del análisis.

Se dispensa una muestra de heces diluidas del paciente en los dos puertos de muestreo del casete, que migra a lo largo de las membranas y a través de las zonas de análisis y control. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la aparición de una línea de un color determinado en la ventana de lectura junto a la letra correspondiente indica un resultado positivo, siempre que también aparezca la línea de control (véase la figura 1).

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máximo de pruebas que se pueden obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

1. Dispositivo Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB: dos tiras reactivas dispuestas en un marco de plástico y dentro de una bolsa de papel de aluminio con un desecante.
2. Frascos de diluyente de la muestra: solución tamponada con azida sódica al 0,095 % como conservante. El diluyente se suministra en un frasco cuentagotas de plástico de un solo uso con una varilla aplicadora. Se usa tal y como viene.
3. Pipetas de transferencia desechables.

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Juego de controles externos con controles positivo y negativo. Ref. Meridian n.º 750501
2. Agitador vórtex
3. Temporizador de intervalos

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son solo para uso diagnóstico in vitro. Para uso profesional exclusivamente.
2. No debe desviarse del método que aquí se describe, ya que podrían obtenerse resultados falsos positivos o negativos. Una vez iniciado el análisis, complete todos los pasos subsiguientes sin interrupción.
3. La muestra del paciente y el dispositivo Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB usados pueden contener agentes infecciosos, y deben manipularse con un nivel 2 de bioseguridad, tal y como se recomienda en el manual de "Bioseguridad en los laboratorios de microbiología y biomedicina" de los CDC y el NIH.
4. No intercambie reactivos de kits que tengan diferentes números de lote, ni utilice reactivos caducados.
5. No utilice el tampón de dilución de muestras si presenta signos de contaminación o precipitación.
6. El tampón de dilución de muestras contiene azida sódica, un compuesto que provoca irritación cutánea. Procure que los reactivos no entren en contacto con la piel. La eliminación de reactivos con azida sódica a través de tuberías de plomo o cobre puede provocar la formación de azidas metálicas explosivas. Esto se puede evitar enjuagando con un gran volumen de agua durante la eliminación.
7. Para poder obtener resultados correctos, es esencial conservar y diluir correctamente las heces. La inoculación de una cantidad excesiva de heces en el diluyente de la muestra puede restringir el flujo dentro del dispositivo Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB, y los resultados no serían válidos. Si las heces no se almacenan correctamente o no se inocula una cantidad suficiente en el diluyente de la muestra, se pueden obtener resultados falsos negativos.
8. Si el envase primario está dañado (bolsa de papel de aluminio o frasco de tampón de dilución), debe desecharse el producto sin usar.
9. No use este producto si aparece una línea de color en el área de resultados de cualquier tira antes de empezar a usarlo.
10. Si se almacena refrigerado, deje que todos los componentes del kit y las muestras fecales alcancen la temperatura ambiente, ya que las muestras o los reactivos fríos pueden afectar al desarrollo de la prueba.
11. No deseché la caja del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. Esta caja lleva información esencial sobre la marca CE del producto y el número de lote.
12. El producto usado debe desecharse de conformidad con la normativa local vigente.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

VIDA ÚTIL Y ALMACENAMIENTO

Almacene el kit Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB a una temperatura de 2-30 C cuando no lo use. La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del kit.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

1. Deje que los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (19-27 °C) antes de hacer una prueba, ya que las muestras o los reactivos fríos pueden reducir la sensibilidad del ensayo. Los reactivos pueden tardar hasta 60 minutos en atemperarse tras haber estado refrigerados.
2. Las heces deben mezclarse bien (independientemente de su consistencia) para garantizar que la muestra sea representativa antes de obtenerla.
3. Cuando dispense las gotas, mantenga los viales de los reactivos en posición vertical para garantizar la uniformidad del tamaño de las gotas y de la dispensación.
4. En ocasiones, puede haber partículas que interfieran con el flujo de la muestra. Si el dispositivo de prueba no absorbe rápidamente la muestra diluida, toque con suavidad la parte inferior del puerto de muestreo con una varilla aplicadora para mover una posible partícula fecal sólida que pudiera estar impidiendo la absorción. Otra posibilidad es extraer una nueva alícuota de la muestra del diluyente y volver a analizarla. Las muestras diluidas que contengan muchas partículas pueden centrifugarse (1-5 minutos a 700 G) o dejarse reposar durante 3-5 minutos antes de continuar.
5. Añada la cantidad adecuada de muestra (unos 110 mg de heces) al frasco de dilución de la muestra. Si la muestra es semilíquida (difícil de dispensar con una pipeta), tome una pequeña porción de heces de unos 5 mm de diámetro (una cantidad suficiente para cubrir las muescas de la varilla de la tapa del diluyente de la muestra). Si la muestra es líquida, añada 110 µL al frasco de dilución de la muestra (4 gotas si se utilizan las pipetas desechables suministradas con el kit). No analice ningún tipo de muestra sin haberla diluido adecuadamente en el diluyente de la muestra.
6. No olvide añadir el volumen correcto de la muestra extraída a los dos puertos de muestreo marcados con una flecha en el dispositivo de plástico. Si el volumen es inferior al indicado, es posible que la muestra no fluya porque no llegue suficiente cantidad de ella a las tiras de reacción; si el volumen es mayor, pueden aparecer líneas marrones en lugar de las esperadas (véase la figura 1).

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Los reactivos se suministran listos para usar. Deje que los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (19-27 °C) antes de usarlos. Mezcle con suavidad el reactivo líquido antes de usarlo. No abra la bolsa del dispositivo hasta que esté listo para hacer el análisis.

RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

La prueba se ha validado para muestras frescas sin tratar. No utilice muestras guardadas en medios de transporte o con conservantes (formalina, SAF, PVA o similares) o medios de enriquecimiento añadidos, ya que su presencia podría interferir con el correcto desarrollo de la prueba.

Las muestras de heces deben transportarse en un recipiente hermético. Conviene analizar la muestra lo antes posible, pero se puede mantener a 2-8 °C un máximo de 2 días antes de analizarla. Si no se pueden analizar en este plazo de tiempo, las muestras deben congelarse en cuanto se reciban y conservarse congeladas (-20 °C) hasta el momento de analizarlas. Las muestras se pueden congelar dos veces. Procure que las muestras hayan alcanzado la temperatura ambiente antes de hacer la prueba.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

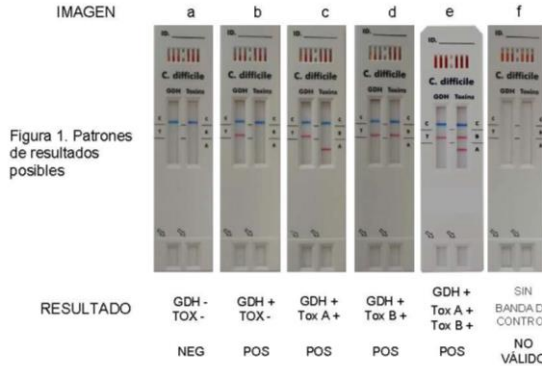
Lleve todas las tarjetas de análisis, los diluyentes de las muestras y las muestras a temperatura ambiente (19-27 °C) antes del análisis. Saque los reactivos de la caja del kit para que se calienten. Los reactivos pueden tardar hasta 60 minutos en atemperarse tras haber estado refrigerados.

1. Etiquete un frasco de diluyente de la muestra para cada muestra de paciente que se vaya a analizar.
2. Desenrosque la tapa del frasco con cuidado para no derramar el tampón de dilución de la muestra.
3. Añada inmediatamente la muestra de heces o los controles como se indica a continuación:
 - a. Heces formadas/sólidas: mezcle muy bien la muestra de heces. Utilizando la varilla que lleva la tapa del frasco, recoja una pequeña porción de 5 mm de diámetro.
 - b. Heces semisólidas: mezcle muy bien la muestra de heces. Usando la varilla que lleva la tapa del frasco, recoja una cantidad de muestra que cubra completamente las ranuras de la varilla.
 - c. Heces líquidas: usando las pipetas desechables que vienen en el kit, mezcle bien la muestra de heces, aspire y dispense en el frasco 4 gotas de heces (correspondientes a un volumen de 110 µL).
 - d. Control externo positivo o negativo: consulte las instrucciones de uso del JUEGO DE CONTROLES EXTERNOS.

- Añada cuidadosamente la muestra al frasco del tampón de dilución correspondiente. Enrosque la tapa bien apretada y agite con fuerza para homogeneizar la mezcla.
- Utilice 1 tarjeta de análisis Immunocard STAT! para cada muestra o control. Cuando esté listo para hacer la prueba, saque la tarjeta de análisis de la bolsa de papel de aluminio. Deseche la bolsa y el desecante. Etiquete el dispositivo con el nombre del paciente o del control.
- Rompa la parte superior de la tapa del frasco usando un trozo de papel para evitar fugas.
- Coloque el frasco invertido en posición vertical y añada 4 gotas de la muestra diluida en el puerto de muestreo de cada tira (ventanas rectangulares marcadas con una flecha).
- Incuba la tarjeta de análisis a 19-27 °C durante 15 minutos.
- A final de la incubación, lea visualmente los resultados de cada tarjeta antes de que hayan pasado 30 segundos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El casete contiene dos tiras: la tira para GDH en el lado izquierdo, y la tira para las toxinas A y B en el lado derecho. Los resultados posibles se ilustran en la figura 1.



RESULTADOS NEGATIVOS: Una banda **AZUL** en la posición de la línea de control (C). No aparece ninguna otra banda en las dos tiras del casete.

Un resultado negativo en la tira del antígeno de GDH indica que no hay antígenos de *C. difficile* en la muestra o que están por debajo del límite de detección del ensayo.

Un resultado negativo en la tira de toxinas indica que no hay toxinas de *C. difficile* en la muestra o que están por debajo del límite de detección del ensayo.

RESULTADOS POSITIVOS PARA GDH: Una banda **ROSADA-ROJA** en la posición de la línea analítica (T), en presencia de una banda **AZUL** en la posición de la línea de control (C) de la TIRA IZQUIERDA del casete. Un resultado positivo indica la presencia de *C. difficile* en la muestra.

RESULTADOS POSITIVOS PARA LAS TOXINAS: Una banda **ROSADA-ROJA** en la posición de la línea de la TOXINA A (A) y/o la TOXINA B (B), en presencia de una banda **AZUL** en la posición de la línea de control (C) de la TIRA DERECHA del casete. Un resultado positivo indica la presencia de toxina(s) de *C. difficile*.

Léala inmediatamente después del periodo de incubación. La aparición de una banda de color **ROSADA-ROJA** en la posición de la línea analítica de GDH, toxina A o toxina B del dispositivo tras un tiempo de incubación prolongado no se debe considerar un resultado positivo.

RESULTADOS NO VÁLIDOS:

Se considera que la prueba no es válida, y por consiguiente no se pueden comunicar los resultados, en los siguientes casos:

- NO APARECEN LÍNEAS DE CONTROL (**AZUL**) en la posición correspondiente a la línea de control (C). La prueba no es válida porque la ausencia de una banda de control indica que el procedimiento analítico no se ha desarrollado correctamente o que los reactivos se han estropeado.
- Presencia de al menos una línea de un COLOR INCORRECTO (por ejemplo: líneas de color rojo oscuro, marrón rojizo o gris, en lugar de **ROSADA-ROJA**). Las bandas con colores distintos al **ROSADA-ROJA** pueden indicar un deterioro del reactivo, errores de procedimiento o la presencia de sustancias interferentes.

Si aparece un resultado **NO VÁLIDO** o difícil de interpretar, debe repetirse la prueba en una nueva preparación de la misma muestra (use un nuevo frasco de diluyente de la muestra). Si obtiene reiteradamente resultados ilegibles con la muestra original, obtenga una nueva muestra y repita el análisis.

SUGERENCIA IMPORTANTE:

Un pequeño porcentaje de las muestras pueden dar un resultado **negativo para el antígeno de GDH pero positivo para una o ambas toxinas**. En tales casos, la prueba se considera «**no notificable**», y debe repetirse con una nueva preparación de la muestra de heces original (véase más arriba).

Si el resultado no varía, es necesario repetir el análisis con una muestra de heces recién obtenida, o bien considerar la posibilidad de utilizar una prueba diagnóstica alternativa adicional, por ejemplo, una PAAN para la detección de los genes Tox A/Tox B en la muestra original.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo y los controles de calidad deben ser realizados siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

Los componentes del kit deben examinarse visualmente cada vez que se vayan a usar para detectar signos evidentes de contaminación microbiana, congelación, fugas o cualquier deterioro.

CONTROLES INTERNOS: Los controles internos se encuentran dentro de la tira reactiva, por lo que se evalúan con cada prueba.

- Las bandas de color **AZUL** que aparecen en las posiciones de las líneas de control sirven de control del procedimiento, e indican que la prueba se ha realizado correctamente, con un flujo adecuado y unos reactivos analíticos con capacidad de reaccionar en el momento de usarse.
- Un fondo limpio alrededor de las líneas de control y analíticas también sirve como control del procedimiento. Un fondo de un color oscuro en las líneas de control o analíticas puede invalidar la prueba, y puede ser indicativo de un deterioro de los reactivos, del uso de una muestra inadecuada o de un mal desarrollo de la prueba.

CONTROLES EXTERNOS: Con cada nuevo lote o envío de kits deben analizarse controles positivos y negativos. El número de pruebas realizadas con los controles externos viene determinado por los requisitos de las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales. Para controlar la reactividad de los reactivos y el desarrollo de la prueba se utilizan controles externos. El hecho de que los controles no produzcan los resultados esperados puede significar que alguno de los reactivos o componentes ya no tiene capacidad de reacción en el momento de usarse, que la prueba no se ha realizado correctamente o que no se han añadido los reactivos o las muestras.

Los resultados esperados con los controles se describen en el apartado **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**. 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. El kit no debe utilizarse si los análisis de los controles no producen los resultados correctos.

VALORES ESPERADOS

La frecuencia de la diarrea postantibiótica causada por *C. difficile* depende de varios factores, incluyendo la población de pacientes, el tipo de institución y la epidemiología. La incidencia comunicada de la enfermedad asociada a *C. difficile* en pacientes sospechosos de tener enfermedades relacionadas con antibióticos es del 15-20 %, aunque en diferentes centros se pueden encontrar tasas positivas superiores o inferiores a estos márgenes.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. La finalidad del ensayo es confirmar la presencia del antígeno común de GDH y de toxinas en las heces del paciente. Un resultado negativo de la prueba no excluye completamente una infección por una cepa toxigénica de *C. difficile*. Los resultados de los análisis deben utilizarse junto con la información del paciente obtenida a través de la evaluación clínica u otros procedimientos de diagnóstico.
2. La prueba es cualitativa, y no se debe hacer una interpretación cuantitativa basada en la intensidad de la línea positiva al comunicar los resultados.
3. La prueba está pensada para usarse con heces humanas frescas; no se ha validado ningún otro tipo de muestra.
4. Una buena conservación de las heces es esencial para poder obtener resultados fiables. La degradación de la muestra puede dar lugar a un resultado negativo falso. Aunque son relativamente estables a 2-8 °C, las toxinas de *C. difficile* se degradan fácilmente a temperatura ambiente, especialmente cuando su concentración es baja. La velocidad a la que las toxinas se degradan difiere de una muestra de paciente a otra y, por lo tanto, no se puede predecir. Por esta razón, las mejores prácticas requieren que, una vez obtenidas, las muestras se refrigeren o se congelen antes de dos horas, y que se analicen en los plazos recomendados en este prospecto. No acepte muestras que no hayan sido obtenidas, manipuladas o transportadas correctamente.
5. Se han identificado dos grupos distintos que pueden albergar tasas muy elevadas de *C. difficile* de forma asintomática. Se han descrito tasas de colonización de hasta el 50 % o más en bebés y tasas de hasta el 32 % en pacientes con fibrosis quística.
6. Si no se añade la cantidad correcta de heces al frasco del diluyente de la muestra, se pueden obtener resultados falsos negativos o positivos.
7. Una incubación excesiva de las pruebas puede dar lugar a resultados falsos positivos. La incubación de las pruebas a una temperatura baja o durante un tiempo corto puede dar lugar a resultados falsos negativos.
8. Las muestras con hemorragia intensa pueden interferir con el ensayo, produciendo un resultado negativo falso o la aparición de bandas inespecíficas. Esto suele ir acompañado de una alteración del color de las bandas. No comunique ningún resultado si las bandas no son del color correcto (las líneas de control deben ser de color **AZUL**, las líneas analíticas deben ser de color **ROSADO-ROJO**); véase la figura 1.
9. Las directrices internacionales recomiendan evitar la repetición de pruebas y las pruebas de curación con cualquier tipo de ensayo de *C. difficile*, ya que los pacientes pueden excretar esporas, ADN y/o toxinas de *C. difficile* bastante tiempo después de que haya desaparecido la diarrea o de la recuperación clínica. Por eso, no es posible establecer el rendimiento de la prueba para comprobar la eficacia de la erradicación (prueba de curación).

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Rendimiento clínico de Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB se ha evaluado en un total de 304 muestras de GDH y 180 de toxinas A y B. Las muestras se obtuvieron de forma retrospectiva y se conservaron congeladas. Se han hecho dos evaluaciones independientes: una en los laboratorios del fabricante y otra por parte de un laboratorio clínico externo independiente.

Las muestras se caracterizaron utilizando inmunoanálisis comerciales para GDH y para las toxinas A y B. Los resultados discordantes se han solventado usando pruebas adicionales, incluido el método de referencia, el «ensayo de citotoxicidad celular y neutralización».

La concordancia positiva se usa para determinar la sensibilidad del ensayo Immunocard STAT! *C. difficile* GDH-AB, mientras que la concordancia negativa se utiliza para evaluar su especificidad.

Resultados comparativos a continuación:

TABLA 1. Evaluación interna del fabricante

| Immunocard STAT1 C. difficile GDH-AB Ensayo de GDH | COMPARADOR: ELISA C. DIFF CHECK – 60 | | |
|--|---|-------------|-------------|
| | POS | NEG | TOTAL |
| POSITIVO | 53 | 0 | 53 |
| NEGATIVO | 0 | 87 | 87 |
| Total | 53 | 87 | 140 |
| | | % | IC 95% |
| Concordancia positiva (sensibilidad clínica) | 53/53 | 100 | 93,2 – 100 |
| Concordancia negativa (especificidad clínica) | 87/87 | 100 | 95,7 – 100 |
| Immunocard STAT1 C. difficile GDH-AB Ensayo de TOXINAS | COMPARADOR: ELISA PROSPECT | | |
| | POS | NEG | TOTAL |
| POSITIVO | 45 | 0 | 45 |
| NEGATIVO | 6* | 85 | 91 |
| Total | 51 | 85 | 136 |
| | | % | IC 95% |
| Concordancia positiva (sensibilidad clínica) | 45/51 | 88,2 | 76,6 – 94,5 |
| Concordancia negativa (especificidad clínica) | 85/85 | 100 | 95,6 – 100 |

*RESULTADOS POSITIVOS confirmados por CCTNA (ensayo de citotoxicidad celular y neutralización)

TABLA 2. Evaluación de un laboratorio independiente

| Immunocard STAT1 C. difficile GDH-AB Ensayo de GDH | COMPARADOR: C. DIFF QUIK CHECK® | | |
|--|---|-------------|-------------|
| | POS | NEG | TOTAL |
| POSITIVO | 42 | 1** | 43 |
| NEGATIVO | 4* | 117 | 121 |
| Total | 46 | 118 | 164 |
| | | % | IC 95% |
| Concordancia positiva (sensibilidad clínica) | 42/46 | 91,3 | 79,7 – 96,6 |
| Concordancia negativa (especificidad clínica) | 117/118 | 99,2 | 95,4 – 99,8 |
| Immunocard STAT1 C. difficile GDH-AB Ensayo de TOXINAS | COMPARADOR: C. DIFF QUIK CHECK® COMPLETE | | |
| | POS | NEG | TOTAL |
| POSITIVO | 19 | 0 | 19 |
| NEGATIVO | 5*** | 20 | 25 |
| Total | 24 | 20 | 44 |
| | | % | IC 95% |
| Concordancia positiva (sensibilidad clínica) | 19/24 | 79,2 | 59,5 – 90,7 |
| Concordancia negativa (especificidad clínica) | 20/20 | 100 | 83,9 – 100 |

RESOLUCIÓN DE RESULTADOS DISCORDANTES

Las muestras discordantes se analizaron con el ELISA C. DIFF CHECKTM 60 de Techlab.

*De las 4 muestras de Immunocard STAT GDH NEG/COMPARADOR POS, 2 resultaron NEGATIVAS, 1 se confirmó como POSITIVA.

**La muestra de Immunocard STAT GDH POS/COMPARADOR NEG resultó NEGATIVA.

***De las 5 muestra de Immunocard STAT TOXINAS NEG/COMPARADOR POS, 2 fueron NEGATIVAS con el tercer ensayo (ELISA), 2 mostraron una concentración de toxina próxima al LD del ensayo y 1 fue POSITIVA.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

El límite de detección (LD) del ensayo se ha determinado de la siguiente manera:

- Ensayo de GDH: para determinar el valor del LD se utilizaron diluciones seriadas de glutamato deshidrogenasa de C. difficile procedentes de TCG BIOMICs. Se obtuvo un valor medio de **0,195 ng/mL**.
- Ensayo de TOX A y B: para determinar el valor del LD se utilizaron diluciones seriadas de toxinas A y B procedentes de TCG BIOMICs. Se obtuvieron unos valores medios de **1,56 ng/mL** para la toxina A y **0,75 ng/mL** para la toxina B.

REPRODUCIBILIDAD

INTERDIARIO

Utilizando el mismo lote que para la prueba de GDH-Toxinas simple, se analizaron por duplicado una curva de sensibilidad y diversas muestras reales caracterizadas como NC («muestra negativa»), LPC («muestra positiva baja») y PC («muestra positiva») para cada analito durante un periodo de cinco días espaciados en el tiempo. Los resultados fueron sumamente reproducibles: se obtuvieron diferencias máximas de ½ dilución.

PRECISIÓN ENTRE TÉCNICOS

Tres técnicos analizaron por triplicado una curva de sensibilidad y diversas muestras reales caracterizadas como NC («muestra negativa»), LPC («muestra positiva baja») y PC («muestra positiva») para cada analito. Las diferencias observadas no superaron ½ dilución con el estándar en ninguno de los casos, y se obtuvieron los mismos resultados con las muestras reales.

PRECISIÓN ENTRE LOTES

Se evaluaron en paralelo tres lotes diferentes de la prueba GDH-Toxinas simple analizando las curvas de sensibilidad y diversas muestras reales caracterizadas como NC («muestra negativa»), LPC («muestra positiva baja») y PC («muestra positiva») para cada analito. El análisis fue realizado por una sola persona el mismo día. Las diferencias máximas fueron inferiores o iguales a ½ dilución con el estándar, y se obtuvieron los mismos resultados con las muestras reales, lo que demuestra la elevada precisión entre lotes de la prueba.

Las diferencias observadas en los apartados de «Reproducibilidad» son aceptables considerando la variabilidad inherente a una técnica inmunocromatográfica cualitativa.

EFFECTO PROZONA/GANCHO

Se han analizado concentraciones muy altas de los tres analitos detectados por el ensayo sin que se observe ninguna disminución en la intensidad de las señales positivas. Estos valores de concentración (superiores a los valores máximos que se pueden encontrar entre la población) son los siguientes:

- GDH: 6000 ng/mL, aproximadamente 30 000 veces el LD del ensayo.
- Toxina A: 3000 ng/mL, aproximadamente 1900 veces el LD del ensayo.
- Toxina B: 3000 ng/mL, aproximadamente 4000 veces el LD del ensayo.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las sustancias indicadas a continuación no interfirieron con los resultados de la prueba cuando se añadieron a muestras de heces (positivas y negativas) a las concentraciones especificadas:

| | |
|---------------------------|-----------------------------------|
| Sangre completa 20% (v/v) | Ibuprofeno 1,41 mg/mL |
| Vancomicina 1,17 mg/mL | Loperamida 9,38 µg/mL |
| Metronidazol 1,17 mg/mL | Ácido acetilsalicílico 2,34 mg/mL |
| Pepto-Bismol 1% (v/v) | Sulfato de bario 4,4 mg/mL |
| Omeprazol 11,7 µg/mL | Mucina 5% (p/p) |
| Cimetidina 7,38 mg/mL | Ácido esteárico-palmitico (1:1) |
| Paracetamol 2,34 mg/mL | |

REACTIVIDAD CRUZADA

Se evaluó la reactividad cruzada del ensayo para detectar diferentes bacterias que pueden estar presentes en el tracto intestinal. Se han hecho dos evaluaciones independientes: una en los laboratorios del fabricante y otra por parte de un laboratorio clínico externo independiente.

Evaluación interna del fabricante

En la prueba no se observó reactividad cruzada con ninguna de las suspensiones bacterianas que figuran a continuación:

| | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 0,25 x 10 ⁸ (UFC/mL) |
| <i>Salmonella spp.</i> | 0,25 x 10 ⁸ (UFC/mL) |
| <i>Campylobacter coli</i> | 0,25 x 10 ⁸ (UFC/mL) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | 0,25 x 10 ⁸ (UFC/mL) |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 0,25 x 10 ⁸ (UFC/mL) |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | 1,56 x 10 ⁵ (UFC/mL) |
| <i>Giardia lamblia</i> (trofozoitos) | 5,5 x 10 ⁶ (células/mL) |
| <i>Giardia lamblia</i> (quistes) | 1,7 x 10 ⁶ (células/mL) |

La prueba se evaluó frente a heces fuertemente positivas para los siguientes microorganismos sin que se observara ninguna reactividad cruzada: Adenovirus, Rotavirus, Norovirus GII, Astrovirus, *Campylobacter spp.*, *Helicobacter pylori*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*.

Se ha registrado una reacción cruzada con una muestra de heces fuertemente positiva para *Entamoeba histolytica* (un resultado positivo débil para la toxina B). Sin embargo, otras pruebas adicionales no confirmaron la reacción cruzada.

Evaluación de un laboratorio externo independiente

Muestras de heces inoculadas con los siguientes agentes microbianos (hasta una concentración final en la muestra de ~1 x 10⁶ organismos/mL)

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus spp.*, *Bacteroides nordii*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 2, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus gossleri*, *Listeria monocitogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Se ratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexnerii*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

NO se produjo una reacción cruzada con ninguno de los organismos de la lista.

INFORMACIÓN Y ASISTENCIA

Para cualquier consulta técnica o reclamación, póngase en contacto con el Servicio Técnico de Meridian Bioscience llamando al teléfono +390331433636 o enviando un correo electrónico a TS@meridianbioscience.com, o llame a nuestro distribuidor en su país (www.meridianbioscience.com/diagnostics/distributors/)

immunocard STAT!

C. difficile GDH-AB

Schneller, einstufiger Immunoassay für den simultanen Nachweis von dem *Clostridium difficile* Antigen Glutamat-Dehydrogenase (GDH) und der Toxine A und B in humanen Stuhlproben

REF 750520

IVD

VERWENDUNGSZWECK

Der Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB Test ist ein qualitativer, immunochromatographischer Schnelltest für den zeitgleichen Nachweis des Antigens Glutamat-Dehydrogenase von *Clostridium difficile* (GDH, wird von toxischen wie nicht-toxischen Stämmen produziert) sowie der von *Clostridium difficile* erzeugten Toxine A und B.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Clostridium difficile ist ein zur Sporenbildung fähiges, gram-positives, anaerobes Bakterium, das symptomfrei in bis zu 5 % der gesunden Bevölkerung vorhanden sein kann.¹ Toxische Stämme von *Clostridium difficile* sind die häufigste Ursache für nosokomiale infektiöse Diarrhö in entwickelten Ländern und ist in rund 25 % aller Fälle der Krankheitserreger bei Antibiotika-assoziierten Diarrhö.² Allein in US-amerikanischen Krankenhäusern werden jährlich schätzungsweise 300.000 Fälle von C. difficile-Infektionen (CDI) beobachtet.^{1, 2} Praktisch jedes Antibiotikum kann einen Patienten für CDI prädisponieren. Das Krankheitsbild einer CDI reicht von einer symptomfreien Besiedelung bis hin zu lebensbedrohlicher pseudomembranöser Kolitis und toxischem Megakolon.² Die pathogenen Stämme von C. difficile produzieren mindestens eines von zwei biologisch und immunologisch unterschiedlichen Toxinen³: Toxin A (Enterotoxin) und Toxin B (Zytotoxin); diese sind die hauptsächlichsten Virulenzfaktoren für die klinischen Anzeichen der Erkrankung.

Glutamat-Dehydrogenase (GDH) ist ein Enzym, das von toxischen und nicht-toxischen Stämmen von C. difficile in großen Mengen produziert wird. Es ist daher ein ausgezeichneter Marker für das Vorhandensein des Mikroorganismus selbst.⁴

Die Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), die Infectious Diseases Society of America (IDSA) und die Europäische Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionskrankheiten (ESCMID) empfehlen unterschiedliche Testmethoden für den Nachweis von toxischen C. difficile im Labor⁵, etwa verschiedene Kombinationen von GDH-, Toxin- und NAAT-Assays. Nach einem aktuell empfohlenen mehrstufigen Algorithmus sollte eine Probe in einem ersten Screening auf GDH untersucht werden; bei einem positivem Ergebnis wird mit einem zweiten Test die Toxizität des Stammes nachgewiesen, da nur die toxischen und pathologischen Stämme des Mikroorganismus Toxine produzieren. Mit dem Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB Test können Labore diesen Ansatz übernehmen und dabei mit einem einstufigen Assay beide Ergebnisse gleichzeitig erhalten.

Ein positives Testergebnis auf das Enzym Glutamat-Dehydrogenase von C. difficile bestätigt das Vorhandensein dieses Organismus in einer Stuhlprobe, ein negatives Ergebnis weist auf seine Abwesenheit hin. Ein positives Testergebnis auf die Toxine A und/oder B bestätigt das Vorhandensein eines toxischen Stammes von C. difficile.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Der Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB Test enthält zwei Streifen in einer Doppelkassette, einen für den Test auf GDH und einen für den Test auf die Toxine A und B:

- Der GDH-Streifen verwendet eine Kombination aus:
 - Rosa-rötlichen Latexpartikeln, konjugiert mit spezifischen Antikörpern gegen von C. difficile produziertes GDH, und GDH-spezifischen Antikörpern, die auf der Testposition unterhalb der Kontrolllinie immobilisiert sind. Falls das Antigen GDH vorhanden ist, wird es während der Inkubation von beiden Antikörpern gebunden, wodurch sich auf der Testposition eine rosa-rötliche Linie entwickelt.
 - Blaue Latexpartikeln, konjugiert mit einem Antigen, das durch einen spezifischen Antikörper für dieses Antigen erkannt wird, sind an die Membran gebunden. Dies definiert die Kontrolllinie des Tests.
- Der Toxinstreifen verwendet eine Kombination aus:
 - Rosa-rötlichen Latexpartikeln, konjugiert mit spezifischen Antikörpern gegen Toxin B, und für Toxin B spezifischen Antikörpern, die auf der B-Position unterhalb der Kontrolllinie immobilisiert sind. Falls Toxin B vorhanden ist, wird es während der Inkubation von beiden Antikörpern gebunden, wodurch sich auf der B-Position eine rosa-rötliche Linie entwickelt.
 - Rosa-rötlichen Latexpartikeln, konjugiert mit spezifischen Antikörpern gegen Toxin A, und für Toxin A spezifischen Antikörpern, die auf der A-Position unterhalb der Toxin-B-Linie immobilisiert sind. Falls Toxin A vorhanden ist, wird es während der Inkubation von beiden Antikörpern gebunden, wodurch sich auf der A-Position eine rosa-rötliche Linie entwickelt.
 - Blaue Latexpartikeln, konjugiert mit einem Antigen, das durch einen spezifischen Antikörper für dieses Antigen erkannt wird, sind an die Membran gebunden. Dies definiert die Kontrolllinie des Tests.

Die verdünnte Stuhlprobe eines Patienten wird in beide Probenöffnungen der Kassette gegeben und migriert entlang der Membranen durch die Test- und die Kontrollzonen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur weist das Erscheinen einer spezifisch gefärbten Linie im Lesefenster neben dem entsprechenden Buchstaben bei Vorhandensein der Kontrolllinie ein positives Ergebnis aus (siehe Abb. 1).

REAGENZ/ENTHALTENE MATERIALIEN

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

- Immunocard STAT! C. difficile GDH-AB-Testvorrichtung: Zwei reaktive Streifen in einem Kunststoffgehäuse, verpackt in einem Folienbeutel mit Trockenmittel.
- Fläschchen mit Probenverdünnungspuffer: Gepufferte Lösung mit 0,095 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Der Verdünnungspuffer wird in einem Einweg-Tropffläschchen aus Kunststoff mit Applikatorstäbchen geliefert. Er ist gebrauchsfertig.
- Einweg-Transferpipetten.

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Externes Kontrollset mit Positiv- und Negativkontrollen. Meridian Bestell- Nr. 750501
2. Vortexmischer
3. Intervall-Stoppuhr

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt. Nur für den professionellen Gebrauch.
2. Von der hier beschriebenen Methode nicht abweichen, da dies falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zur Folge haben könnte. Sobald der Test gestartet wurde, führen Sie alle weiteren Schritte ohne Unterbrechung durch.
3. Patientenproben und gebrauchte Immunocard STAT1 C. *difficile* GDH-AB-Testvorrichtungen können infektiöse Erreger enthalten und müssen gemäß biologischer Sicherheitsstufe 2 wie im CDC/NIH-Handbuch „Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories“ empfohlen wird, gehandhabt werden.
4. Tauschen Sie die Reagenzien unterschiedlicher Kit-Chargennummern nicht aus, verwenden Sie keine abgelaufenen Reagenzien.
5. Verwenden Sie den Probenverdünnungspuffer nicht, wenn Anzeichen auf eine Kontamination oder Präzipitation vorliegen.
6. Der Probenverdünnungspuffer enthält Natriumazid und damit eine hautreizende Substanz. Vermeiden Sie einen Kontakt der Haut mit den Reagenzien. Eine Entsorgung von Reagenzien mit Natriumazid in Blei- oder Kupferrohre kann zur Bildung explosiver Metallazide führen. Dies kann durch Spülen mit großen Mengen Wasser während einer derartigen Entsorgung vermieden werden.
7. Eine ordnungsgemäße Lagerung und Verdünnung der Stuhlproben ist wesentlich, um korrekte Ergebnisse zu gewährleisten. Ein Überbeimpfen von Stuhlproben in den Probenverdünnungspuffer kann den Fluss innerhalb der Immunocard STAT1 C. *difficile* GDH-AB-Testvorrichtung behindern und zu ungültigen Ergebnissen führen. Eine nicht ordnungsgemäße Lagerung von Stuhlproben oder eine Unterbeimpfung in den Probenverdünnungspuffer können falsch negative Ergebnisse zur Folge haben.
8. Bei beschädigter Primärverpackung (Folienbeutel oder Fläschchen des Verdünnungspuffers) muss das Produkt entsorgt und darf nicht verwendet werden.
9. Dieses Produkt darf nicht verwendet werden, wenn im Ergebnisbereich eines der Teststreifen vor Testbeginn eine farbige Linie erscheint.
10. Falls der Test gekühlt gelagert wird, sollten die Komponenten des Kits und die Stuhlproben vor Testbeginn Raumtemperatur erreichen, da kalte Reagenzien und/oder Proben die Funktionalität des Tests beeinträchtigen können.
11. Die Kitpackung erst entsorgen, wenn der gesamte Inhalt aufgebraucht ist. Diese Packung enthält wichtige Informationen zur CE-Kennzeichnung des Produkts und zur Chargennummer.
12. Das verwendete Produkt sollte gemäß den geltenden lokalen Richtlinien entsorgt werden.

GEFAHREN- UND SICHERHEITSHINWEISE

Es gibt keine bekannten Gefahren, die mit diesem Produkt verbunden sind.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Immunocard STAT1 C. *difficile* GDH-AB-Kit bei 2–30 C aufbewahren, wenn es nicht in Gebrauch ist. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Kits angegeben.

HINWEISE ZUR DURCHFÜHRUNG

1. Vor der Durchführung eines Tests die Kitkomponenten und Proben auf Raumtemperatur (19–27 C) erwärmen lassen, da kalte Reagenzien und/oder Proben die Testempfindlichkeit reduzieren können. Es kann bis zu 60 Minuten dauern, bis die Reagenzien nach der Kühlung aufgewärmt sind.
2. Die Stuhlproben müssen vor der Probenahme gründlich gemischt werden (unabhängig von der Konsistenz), um die Repräsentativität der Probe zu gewährleisten.
3. Halten Sie die Reagenzröhrchen bei der Abgabe von Tropfen vertikal, um eine gleichförmige Tropfengröße und Abgabe zu gewährleisten.
4. Gelegentlich können Partikel den Probenfluss beeinträchtigen. Wenn die Testvorrichtung die verdünnte Probe nicht ohne Weiteres absorbiert, berühren Sie die Unterseite der Probenöffnung vorsichtig mit einem Applikatorstäbchen, um die festen Stuhlpartikel zu bewegen, die die Absorption verhindern. Alternativ kann ein neues Aliquot der Probe aus dem Verdünnungspuffer entnommen und erneut getestet werden. Verdünnte Proben, die eine hohe Partikelkonzentration enthalten, können zentrifugiert (1–5 Minuten bei 700 x G) oder für 3–5 Minuten stehen gelassen und erst dann weiter bearbeitet werden.
5. Stellen Sie sicher, dass Sie die richtige Probenmenge (etwa 110 mg Stuhl) in das Probenverdünnungsröhrchen geben. Bei halbflüssigen Proben nehmen Sie (schwierig mit einer Pipette zu dispensieren) eine kleine Menge Stuhl mit einem Durchmesser von etwa 5 mm (ausreichende Menge, um die Rillen des Stäbchens in der Kappe des Probenverdünnungsmittels zu bedecken). Bei flüssigen Proben geben Sie 110 µl in das Probenverdünnungsröhrchen (4 Tropfen, falls die mit dem Kit gelieferten Einwegpipetten verwendet werden). Testen Sie keine Proben ohne die ordnungsgemäße Verdünnung im Probenverdünnungsmittel.
6. Achten Sie darauf, ein korrektes Volumen der extrahierten Probe in die beiden Probenöffnungen zu überführen; die auf der Kunststoffvorrichtung mit einem Pfeil markiert sind. Ist das Volumen geringer als angegeben, fließt die unzureichende Probenmenge möglicherweise nicht bis zu den Reaktionsstreifen; bei höherem Volumen können anstelle der erwarteten Linien braune Linien erscheinen (siehe Abb. 1).

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Die Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert. Vor der Verwendung die Kitkomponenten und Proben auf Raumtemperatur (19–27 C) erwärmen lassen. Das flüssige Reagenz vor der Verwendung vorsichtig mischen. Den Beutel mit der Testvorrichtung erst unmittelbar vor der Testdurchführung öffnen.

PROBENNAHME UND -LAGERUNG

Der Test ist für frische unbehandelte Proben validiert. Verwenden Sie keine in Transportmedien gesammelte Proben, denen Konservierungsmittel zugesetzt wurden (etwa Formalin, SAF, PVA oder ähnliche Substanzen) oder die Anreicherungsmedien enthalten, da diese Substanzen die fehlerfreie Testdurchführung behindern könnten.

Die Stuhlproben sollten in einem luftdichten Behälter transportiert werden. Die Proben sollten so bald wie möglich getestet werden, können aber vor dem Testen bei Kühlung (2–8 C) bis zu 2 Tage gelagert werden. Falls der Test nicht innerhalb dieses Zeitrahmens durchgeführt werden kann, müssen die Proben unmittelbar nach ihrem Eingang eingefroren und bis zum Testen tiefgekühlt (-20 C) aufbewahrt werden. Die Proben können zwei Mal eingefroren und aufgetaut werden. Vergewissern Sie sich vor dem Testen, dass die Proben sich auf Raumtemperatur erwärmt haben.

TESTDURCHFÜHRUNG

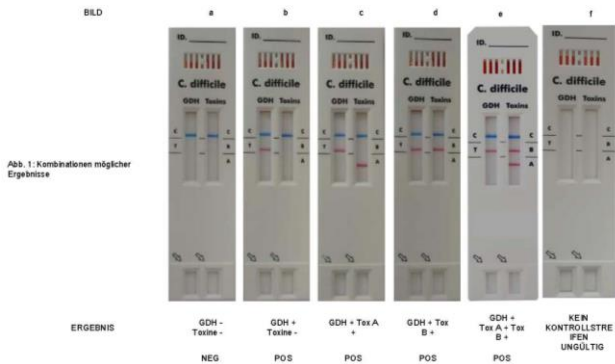
Bringen Sie vor dem Testen alle Testkarten, den Probenverdünnungspuffer und die Proben auf Raumtemperatur (19–27 C). Entnehmen Sie dafür die Reagenzien aus der Kitpackung, damit diese sich erwärmen können. Es kann bis zu 60 Minuten dauern, bis die Reagenzien sich nach der Kühlung aufgewärmt sind.

1. Beschriften Sie für jede zu testende Patientenprobe ein Fläschchen des Probenverdünnungspuffers.
2. Schrauben Sie den Deckel vorsichtig vom Fläschchen ab, um die Pufferlösung zur Probenverdünnung nicht zu verschütten.
3. Fügen Sie die Stuhlproben oder Kontrollen sofort folgendermaßen hinzu:
 - a. Geformte/feste Stühle: Mischen Sie die Stuhlprobe gründlich. Gewinnen Sie mithilfe des am Fläschchendeckel befestigten Stäbchens eine kleine Menge von 5 mm Durchmesser.

- b. Halbfeste Stühle: Mischen Sie die Stuhlprobe gründlich. Gewinnen Sie mithilfe des am Fläschchendeckel befestigten Stäbchens eine ausreichende Probenmenge, um die Furchen des Stäbchens vollständig zu bedecken.
- c. Flüssige Stühle: Mischen Sie die Stuhlprobe unter Verwendung der im Kit enthaltenen Einwegpipetten gründlich. Entnehmen und überführen Sie 4 Tropfen der Stuhlprobe (entsprechend einem Volumen von 110 µL) in das Fläschchen.
- d. Externe Positiv- oder Negativkontrolle: Gehen Sie nach der Gebrauchsanweisung des EXTERNEN KONTROLLSETS vor.
4. Fügen Sie die Probe sorgfältig dem entsprechenden Fläschchen mit dem Verdünnungspuffer hinzu. Schrauben Sie den Deckel fest und schütteln Sie das Fläschchen kräftig, um eine homogene Mischung zu erhalten.
5. Verwenden Sie 1 Immunocard STAT! Testkarte pro Probe oder Kontrolle. Wenn Sie zur Durchführung des Tests bereit sind, entnehmen Sie die Testkarte aus dem Folienbeutel. Entsorgen Sie den Beutel und das Trocknungsmittel. Beschriften Sie die Testvorrichtung mit dem Namen des Patienten bzw. der Kontrolle.
6. Brechen Sie den Fläschchendeckel oben ab und verwenden Sie dabei ein Stück Papier, um ein Austreten von Flüssigkeit zu verhindern.
7. Drehen Sie das Fläschchen um, wobei es in vertikaler Position verbleibt, und geben Sie 4 Tropfen der verdünnten Probe in die Probenöffnung (rechteckiges, mit Pfeil markiertes Fenster) eines jeden Streifens.
8. Inkubieren Sie die Testkarte bei 19–27 °C für eine Dauer von 15 Minuten.
9. Lesen Sie die Ergebnisse der Karten nach Inkubationsende innerhalb von 30 Sekunden visuell ab.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Kassette enthält zwei Teststreifen: auf der linken Seite den Streifen für GDH und auf der rechten Seite den Streifen für die Toxine A und B. Die möglichen Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt.



NEGATIVE ERGEBNISSE: Eine **BLAUE** Linie auf Höhe der Kontrolllinie (C). Keine weiteren Linien auf beiden Streifen der Kassette.

Ein negatives Ergebnis auf dem Streifen für das GDH-Antigen bedeutet, dass das Antigen von *C. difficile* in der Probe entweder gar nicht oder in einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Assays vorliegt.

Ein negatives Ergebnis auf dem Toxinstreifen bedeutet, dass die Toxine von *C. difficile* in der Probe entweder gar nicht oder in einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Assays vorliegen.

POSITIVE ERGEBNISSE FÜR GDH: EINE **ROSA-rötliche** Linie auf der Höhe der Testlinie (T) bei Vorhandensein einer **BLAUEN** Linie auf der Höhe der Kontrolllinie (C) auf dem LINKEN STREIFEN der Kassette. Ein positives Ergebnis weist auf das Vorhandensein von *C. difficile* in der Probe hin.

POSITIVE ERGEBNISSE FÜR TOXINE: EINE **ROSA-rötliche** Linie auf der Höhe der Testposition für TOXIN A (A) und/oder TOXIN B (B) bei Vorhandensein einer **BLAUEN** Linie auf der Höhe der Kontrolllinie (C) auf dem RECHTEN STREIFEN der Kassette. Ein positives Ergebnis weist auf das Vorhandensein der Toxine von *C. difficile* hin.

Lesen Sie das Ergebnis umgehend nach der Inkubationszeit ab. Jede **ROSA-rötliche** Linie, die nach verlängerter Inkubationszeit auf Höhe der GDH-, Toxin-A- oder Toxin-B-Testlinien des Produkts erscheint, darf nicht als positiv gemeldet werden.

UNGÜLTIGE ERGEBNISSE:

In den folgenden Fällen ist der Test als ungültig zu betrachten und die Ergebnisse können nicht berichtet werden:

- FEHLEN DER KONTROLLINIEN (**BLAUE**) auf Höhe der Kontrolllinie (C) auf einem oder beiden Teststreifen. Das Ausbleiben der Kontrolllinie weist darauf hin, dass der Test fehlerhaft durchgeführt wurde oder ein Zerfall der Reagenzien aufgetreten ist. Der Test ist somit ungültig.
- Vorliegen von mindestens einer Linie in der FALSCHEN FARBE (zum Beispiel dunkelrot, rötlich-braun und grau statt **ROSA-rötliche**) Linien in anderen Farben als **ROSA-rötliche** können auf einen Zerfall der Reagenzien, Verfahrensfehler oder das Vorliegen störender Substanzen hindeuten.

Wenn Ergebnisse **UNGÜLTIG** oder **schwer zu interpretieren** sind, muss der Test mit einer neuen Vorbereitung derselben Probe (Verwendung eines neuen Probenverdünnungsrohrchens) wiederholt werden. Wenn die ursprüngliche Probe wiederholt zu unlesbaren Ergebnissen führt, nehmen Sie eine neue Probe und testen Sie erneut.

WICHTIGE EMPFEHLUNG:

In seltenen Fällen wird kann das Ergebnis einer Probe **negativ für das GDH-Antigen, jedoch positiv für Toxin(e)** ausfallen. In diesen Fällen ist das Ergebnis als „**nicht meldefähig**“ zu betrachten und der Test mit einer neuen Vorbereitung der ursprünglichen Stuhlprobe (siehe oben) zu wiederholen.

Wenn kein neues Ergebnis erzielt wird, muss der Test mit einer neu genommenen Stuhlprobe wiederholt werden oder die Verwendung eines alternativen zusätzlichen Diagnostik-Tests in Betracht gezogen werden, wie ein NAAT-Test zum Nachweis von Tox-A/Tox-B-Genen in der ursprünglichen Probe.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

Die Kitkomponenten müssen zum Zeitpunkt der jeweiligen Verwendung visuell auf offensichtliche Anzeichen einer mikrobieller Kontamination, Einfrieren, Auslaufen oder Beschädigung untersucht werden.

INTERNE KONTROLLEN: Interne Kontrollen sind im Teststreifen enthalten und werden daher bei jedem Test evaluiert.

- Die **BLAUEN** Kontrolllinien auf Höhe von Position „C“ dienen der Verfahrenskontrolle. Ihr Vorhandensein bedeutet, dass der Test korrekt durchgeführt wurde, dass der Probenfluss ordnungsgemäß erfolgte, und dass die Testreagenzien zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv waren.
- Auch ein sauberer Hintergrund rund um die Kontroll- und Testlinien dient als Verfahrenskontrolle. Wenn die Kontroll- oder Testlinien von dunkler Hintergrundfarbe verdeckt werden, kann dies den Test ungültig machen und ein Hinweis darauf sein, dass die Reagenzien zerfallen sind, eine ungeeignete Probe verwendet wurde oder die Testdurchführung fehlerhaft war.

EXTERNE KONTROLLEN: Mit jeder neuen Kit-Chargennummer oder jeder neuen Lieferung müssen externe Positiv- und Negativkontrollen getestet werden. Die Anzahl der mit den externen Kontrollen durchzuführenden Tests hängt von den Anforderungen der lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen ab. Die Externe Kontrollen dienen zur Überwachung der Reaktivität von Reagenzien und der Testdurchführung. Wenn die Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse erbringen, kann dies bedeuten, dass eines der Reagenzien oder eine der Komponenten zum Verwendungszeitpunkt nicht mehr reaktiv war, dass der Test nicht ordnungsgemäß durchgeführt wurde oder dass die Reagenzien oder die Proben nicht hinzugefügt worden sind.

Die für die Kontrollen erwarteten Ergebnisse sind im Abschnitt AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE beschrieben. Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, wiederholen Sie als Erstes zur Ermittlung der Fehlerquelle die Kontrolltests. Das Kit sollte nicht verwendet werden, wenn die Kontrolltests nicht die richtigen Ergebnisse erzeugen.

ERWARTETE WERTE

Die Häufigkeit des Auftretens von Antibiotika-assoziierten, durch *C. difficile* verursachter, Diarrhö hängt von verschiedenen Faktoren ab, darunter der Patientenpopulation, der Art der Einrichtung und der Epidemiologie. Das gemeldete Vorkommen von *C. difficile*-assoziierten Erkrankungen von Patienten, deren Erkrankung als Antibiotika-assoziiert angenommen wird, liegt bei 15–20 %; dieser Prozentsatz kann in anderen Einrichtungen höher oder niedriger liegen.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Der Assay ist dafür vorgesehen, das Vorhandensein des von allen Stämmen produzierten Antigens GDH und von Toxinen in Stuhlproben von Patienten zu bestätigen. Ein negatives Testergebnis schließt eine Infektion mit einem toxischen *C. difficile*-Stamm nicht vollständig aus. Die Testergebnisse sollten unter Berücksichtigung von Informationen aus der klinischen Evaluierung des Patienten und anderen diagnostischen Verfahren genutzt werden.
2. Es handelt sich um einen qualitativen Test; bei der Auswertung des Ergebnisses kann aus der Farbintensität der positiven Linie keinerlei quantitativer Schluss gezogen werden.
3. Der Test ist zur Verwendung mit humanem Stuhlproben ohne Konservierungsmittel vorgesehen, jegliche andere Probenart wurde nicht validiert.
4. Eine korrekte Konservierung der Stuhlproben ist entscheidend für eine Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Ein Zerfall von Probenmaterial kann falsch negative Ergebnisse verursachen. Die Toxine von *C. difficile* sind bei 2–8 °C relativ stabil, zerfallen aber bei Raumtemperatur leicht, besonders in geringen Konzentrationen. Die Geschwindigkeit dieses Zerfalls ist für jede Patientenprobe unterschiedlich und kann daher nicht prognostiziert werden. Daher erfordert die gute Praxis, Proben innerhalb von zwei Stunden nach der Gewinnung zu kühlen oder einzufrieren und innerhalb des in dieser Gebrauchsanleitung empfohlenen Zeitraums zu testen. Nehmen Sie keine Proben an, die nicht ordnungsgemäß gewonnen, gehandhabt oder transportiert wurden.
5. Es wurden zwei Patientengruppen identifiziert, die zu einem sehr hohen Prozentsatz symptomfrei von *C. difficile* besiedelt sein können. Bei Säuglingen und Kleinkindern wurden Kolonisierungsraten von bis zu 50 % und höher berichtet; bei Patienten mit Mukoviszidose liegt dieser Prozentsatz bei 32 %.
6. Falls dem Fläschchen mit dem Probenverdünnungspuffer nicht die korrekte Menge Stuhl hinzugefügt wird, kann dies falsch negative oder falsch positive Ergebnisse verursachen.
7. Eine Überinkubation von Tests kann falsch positive Ergebnisse erbringen. Die Inkubation von Tests bei niedrigeren Temperaturen oder für einen kürzeren Zeitraum kann falsch negative Ergebnisse ergeben.
8. Hochgradig hämorrhagische Proben können den Test beeinträchtigen und zu falsch negativen Ergebnissen führen oder untypische Linien ergeben. Derartige Fälle gehen oft mit einer Farbveränderung der Linien einher. Falls die Linien nicht die korrekte Farbe aufweisen (Kontrolllinien müssen **BLAU**, Testlinien müssen **ROSA-RÖTLICH SEIN**), **DÜRFEN DIE ERGEBNISSE NICHT BERICHTET WERDEN** – Siehe Abb. 1.
9. In internationalen Leitlinien wird der Verzicht auf wiederholte Tests und Tests zur Bestätigung der Heilung mit jeglichen Tests auf *C. difficile* empfohlen, da Patienten Sporen, DNA und/oder Toxine von *C. difficile* über einen längeren Zeitraum nach Abklingen der Diarrhöe oder der klinischen Genesung abgeben können. Aus diesem Grund kann die Leistung des Tests hinsichtlich Überprüfung der Wirksamkeit der Eradikation (Test zur Bestätigung der Heilung) nicht festgestellt werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Die klinische Leistung von ImmunoCard STAT! Insgesamt 304 Proben für GDH und 180 Proben für die Toxine A und B wurden auf *C. difficile* GDH-AB getestet. Die Proben wurden retrospektiv gewonnen und tiefgekühlt gelagert. Es wurden zwei unabhängige Beurteilungen durchgeführt: eine im Labor des Herstellers und eine in einem externen, unabhängigen, Labor.

Die Proben wurden mithilfe von kommerziellen Immunoassays auf GDH und die Toxine A und B untersucht. Widersprüchliche Ergebnisse wurden durch zusätzliche Tests aufgelöst, einschließlich unter Verwendung des Goldstandards, „Zell-Zytotoxizitäts- und Neutralisierungstest“.

Die positive Übereinstimmung wird zur Bestimmung der Spezifität des ImmunoCard STAT! *C. difficile* GDH-AB-Assays verwendet, während die negative Übereinstimmung zur Bestimmung der Spezifität verwendet wird.

Vergleichbare Ergebnisse unten:

TABELLE 1 – Interne Bewertung des Herstellers

| Immunocard STAT! C.difficile GDH-AB GDH-Test | VERGLEICHSPRODUKT: ELISA C. DIFF CHECK – 60 | | |
|---|--|-------------|-------------|
| | POS | NEG | GESAMT |
| POSITIV | 53 | 0 | 53 |
| NEGATIV | 0 | 87 | 87 |
| Gesamt | 53 | 87 | 140 |
| | | % | KI 95% |
| Positive Übereinstimmung (Klinische Sensitivität) | 53/53 | 100 | 93,2 – 100 |
| Negative Übereinstimmung (Klinische Spezifität) | 87/87 | 100 | 95,7 – 100 |
| Immunocard STAT! C.difficile GDH-AB TOXIN-Assay | VERGLEICHSPRODUKT: ELISA PROSPECT | | |
| | POS | NEG | GESAMT |
| POSITIV | 45 | 0 | 45 |
| NEGATIV | 6* | 85 | 91 |
| Gesamt | 51 | 85 | 136 |
| | | % | KI 95% |
| Positive Übereinstimmung (Klinische Sensitivität) | 45/51 | 88,2 | 76,6 – 94,5 |
| Negative Übereinstimmung (Klinische Spezifität) | 85/85 | 100 | 95,6 – 100 |

*POSITIVE ERGEBNISSE bestätigt durch CCTNA (Zell-Zytotoxizitäts- und Neutralisierungstest)

TABELLE 2 – Bewertung des unabhängigen Labors

| Immunocard STAT! C.difficile GDH-AB GDH-Test | VERGLEICHSPRODUKT: C. DIFF QUIK CHECK® | | |
|---|--|-------------|-------------|
| | POS | NEG | GESAMT |
| POSITIV | 42 | 1** | 43 |
| NEGATIV | 4* | 117 | 121 |
| Gesamt | 46 | 118 | 164 |
| | | % | KI 95% |
| Positive Übereinstimmung (Klinische Sensitivität) | 42/46 | 91,3 | 79,7 – 96,6 |
| Negative Übereinstimmung (Klinische Spezifität) | 117/118 | 99,2 | 95,4 – 99,8 |
| Immunocard STAT! C.difficile GDH-AB TOXIN-Assay | VERGLEICHSPRODUKT: C. DIFF QUIK CHECK® COMPLETE | | |
| | POS | NEG | GESAMT |
| POSITIV | 19 | 0 | 19 |
| NEGATIV | 5*** | 20 | 25 |
| Gesamt | 24 | 20 | 44 |
| | | % | KI 95% |
| Positive Übereinstimmung (Klinische Sensitivität) | 19/24 | 79,2 | 59,5 – 90,7 |
| Negative Übereinstimmung (Klinische Spezifität) | 20/20 | 100 | 83,9 – 100 |

AUFLÖSUNG WIDERSPRÜCHLICHER ERGEBNISSE

Die widersprüchlichen Ergebnisse wurden mithilfe des Techlab ELISA C. DIFF CHECKTM 60 analysiert.

*Von den 4 Proben mit dem Ergebnis „Immunocard STAT GDH: NEGATIV/VERGLEICHSPRODUKT: POSITIV“ wurden 2 als NEGATIV und 1 als POSITIV bestätigt.

**Die Probe mit dem Ergebnis „Immunocard STAT GDH: POSITIV/VERGLEICHSPRODUKT: NEGATIV“ wurde als negativ bestimmt.

***Von den 5 Proben mit dem Ergebnis „Immunocard STAT TOXINS: NEGATIV/VERGLEICHSPRODUKT: POSITIV“ wurden 2 mithilfe des dritten Tests (ELISA) als NEGATIV bestimmt, 2 Proben zeigten eine Toxinkonzentration nahe der Nachweisgrenze (LoD) des Tests und 1 war POSITIV.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde folgendermaßen ermittelt:

- Test auf GDH: Es wurden Serienverdünnung von *C. difficile* Glutamatdehydrogenase von TCG BIOMICS zur Bestimmung des LoD-Werts verwendet. Es ergab sich ein Mittelwert von **0,195 ng/mL**.
- Test auf TOX A&B: Es wurden Serienverdünnung der Toxine A und B von TCG BIOMICS zur Bestimmung des LoD-Werts verwendet. Für Toxin A ergab sich ein Mittelwert von **1,56 ng/mL**, für Toxin B ein Mittelwert von **0,75 ng/mL**.

REPRODUZIERBARKEIT

INTER-TAG

Unter Verwendung derselben Charge des Simple GDH-Toxins-Assays wurde eine Sensitivitätskurve gemessen und die realen Proben als „NC“ („negative Probe“), „LCP“ („schwach positive Probe“) und „PC“ („positive Probe“) für jeden Analyt bei zweifacher Testung über einen Zeitraum von fünf Tagen ermittelt. Die Ergebnisse waren sehr reproduzierbar und ergaben maximale Unterschiede von 1/2 Verdünnung.

INTER-ANWENDER-PRÄZISION

Drei Anwender haben bei dreifacher Testung eine Sensitivitätskurve für jeden Analyt getestet und die realen Proben als „NC“ („negative Probe“), „LCP“ („schwach positive Probe“) und „PC“ („positive Probe“) für jeden Analyt ermittelt. Die beobachteten Unterschiede lagen in keinem der Fälle bei mehr als 1/2 Verdünnung mehr oder weniger als beim Standard, und die 30leichen Ergebnisse wurden mit den realen Proben erzielt.

INTER-CHARGEN-PRÄZISION

Es wurden drei verschiedene Chargen des Simple GDH-Toxins parallel durch Analyse der Sensitivitätskurven bewertet und die realen Proben wurden als „NC“ („negative Probe“), „LCP“ („schwach positive Probe“) und „PC“ („positive Probe“) für jeden Analyt ermittelt. Die Analyse wurde von nur einer Person am selben Tag durchgeführt. Die maximalen Unterschiede geringer oder gleich 1/2 Verdünnung zum Standard, und die gleichen Ergebnisse wurden mit den realen Proben erzielt, was ein Beweis für die hohe Inter-Charge-Präzision des Tests ist.

Die Unterschiede in den Bereichen „Reproduzierbarkeit“ sind für die qualitative immunochromatographische Methode akzeptabel, der stets eine gewisse Variabilität innewohnt.

PROZONEN/HOOK-EFFEKT

Die drei durch den Assay nachgewiesenen Analyte wurden in sehr hohen Konzentrationen getestet, ohne dass eine abnehmende Intensität der positiven Signale beobachtet worden wäre. Diese Konzentrationswerte (höher als die in der Population zu findenden Maximalwerte) waren:

- GDH: 6000 ng/mL, etwa das 30.000-fache der Nachweisgrenze des Assays.
- Toxin A: 3000 ng/mL, etwa das 1900-fache der Nachweisgrenze des Assays.
- Toxin B: 3000 ng/mL, etwa das 4000-fache der Nachweisgrenze des Assays.

STÖRSUBSTANZEN

Die unten aufgeführten Substanzen hatten keinerlei Auswirkungen auf die Testergebnisse, wenn sie Stuhlproben (positiven und negativen) in der angegebenen Konzentration hinzugefügt wurden:

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| Vollblut 20% (v/v) | Ibuprofen 1,41 mg/mL |
| Vancomycin 1,17 mg/mL | Loperamid 9,38 µg/mL |
| Metronidazol 1,17 mg/mL | Acetylsalicylsäure 2,34 mg/mL |
| Pepto-Bismol 1% (v/v) | Bariumsulfat 4,4 mg/mL |
| Omeprazol 11,7 µg/mL | Muzin 5% (w/w) |
| Cimetidin 7,38 mg/mL | Stearin-Palmitinsäure (1:1) |
| Paracetamol 2,34 mg/mL | |

KREUZREAKTIVITÄT

Die Kreuzreaktivität des Assays wurde für verschiedene Bakterien evaluiert, die im Verdauungstrakt vorhanden sein können. Es wurden zwei unabhängige Beurteilungen durchgeführt: eine im Labor des Herstellers und eine in einem externen, unabhängigen, Labor.

Interne Bewertung des Herstellers

Der Assay zeigte keine Kreuzreaktivität mit den im Folgenden aufgeführten Keimsuspensionen:

| | |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 0,25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Salmonella</i> spp. | 0,25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Campylobacter coli</i> | 0,25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | 0,25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 0,25 x 10 ⁸ (CFU/mL) |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | 1,56 x 10 ⁵ (CFU/mL) |
| <i>Giardia lamblia</i> (Trophoziten) | 5,5 x 10 ⁶ (buñky/mL) |
| <i>Giardia lamblia</i> (Zysten) | 1,7 x 10 ⁶ (buñky/mL) |

Der Test wurde an Stuhlproben bewertet, die für folgende Mikroorganismen ohne beobachtete Kreuzreaktivität stark positiv: Adenovirus, Rotavirus, Norovirus GII, Astrovirus, *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*.

Adenovirus, Rotavirus, Norovirus GII, Astrovirus, *Campylobacter* spp., *Helicobacter* spp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*.

Es wurde eine Kreuzreaktion mit einer Stuhlprobe registriert, die stark 30positive auf *Entamoeba histolytica* war (ein schwach positives Ergebnis für Toxin B). Weitere zusätzliche Tests konnten die Kreuzreaktion jedoch nicht bestätigen.

Bewertung des unabhängigen externen Labors

Stuhlproben, die mit den folgenden Erregern beimpft wurden (zu einer finalen Probenkonzentration von etwa 1 x 10⁸ Keime/mL)

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus* spp., *Bacteroides nordii*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium cadaveris*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 2, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus gossleri*, *Listeria monocitogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Se ratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

KEINE der aufgeführten Keime zeigte eine Kreuzreaktivität mit dem Assay.

INFORMATION UND UNTERSTÜTZUNG

Für technische Anfragen und Beschwerden wenden Sie sich an den Technischen Support von Meridian Bioscience unter +390331433636 – E-Mail: TS@meridianbioscience.com oder rufen Sie den Vertriebshändler in Ihrem Land an (www.meridianbioscience.com/diagnostics/distributors)



REFERENCES

1. Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, Gerding DN, Johnson S, Just I, Lyerly DM, Popoff MR, Rood JI, Sonenshein AL, Thelestam M, Wren BW, Wilkins TD and von Eichel-Streiber C. Revised nomenclature of Clostridium difficile toxins and associated genes. J Med Microbiol 2005 Feb 54(2):113-117.
2. Vonberg RP, Reichardt C, Behnke M, Schwab F, Zindler S and Gastmeier P. Costs of nosocomial Clostridium difficile associated diarrhoea. J Hosp Infect 2008 Sep 70(1):15-20.
3. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A and Minton NP. The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile infection. Nature 2010 Oct 467(7316):711-713.
4. Shetty N, Wren MW, Coen PG. The role of glutamate dehydrogenase for the detection of Clostridium difficile in faecal samples: a meta-analysis. J Hosp Infect 2011 Jan 77(1):1-6.
5. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH; Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. 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). Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2010 May 31(5):431-55.
6. Wilcox MH, Planche T, Fang FC and Gilligan P. What is the current role of algorithmic approaches for diagnosis of Clostridium difficile infection. J Clin Microbiol 2010 Dec 48(12):4347-53.
7. Wren MW, Sivapalan M, Kinson R and Shetty NR. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory. Br J Biomed Sci 2009;66 (1):1-5.
8. Crobach MJ, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for Clostridium difficile infection. Clin Microbiol Infect 2016 Aug 22(Suppl 4):S63-81.



SN750520IFU













REV. 06/23

| | |
|---|--|
|  | <p>Meridian Bioscience Europe SRL Via Dell'industria 7 – 20035 Villa Cortese (Milano) – Italy Telephone: (+39) 0331433636 - E-mail: info@meridianbioscience.eu www.meridianbioscience.com</p> |
| | <p>Product Support: mbe-techservice@meridianbioscience.eu For IFUs & MSDS: www.meridianbioscience.com/diagnostics</p> |
|  <p>Authorized Representative in Switzerland</p> | <p>MedEnvoy Switzerland Gotthardstrasse 28 6302 Zug Switzerland</p> |

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

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

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, Zeichenerklärung)

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