

# ***Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin Kit**

A Toxin/Antitoxin Kit for the Detection of  
*Clostridium difficile* Toxin in Clinical Specimens  
Catalog No. T5000

ESPAÑOL p. 8  
Kit de toxina/antitoxina para la detección de la toxina  
de *C. difficile* en muestras clínicas  
Prod. No. T5000

DEUTSCH p. 14  
Toxin/Antitoxin-Kit für den Nachweis von *C. difficile*-Toxin  
in klinischen Proben  
Katalognummer T5000

FRANÇAISE p. 20  
Un kit Toxine/Antitoxine pour la détection de la Toxine de  
*C. difficile* dans des échantillons de selles  
Numéro de Catalogue T5000



**TECHLAB®**

Blacksburg, VA 24060  
U.S. only, 1-800-TECHLAB  
TEL.: (540) 953-1664 FAX: (540) 953-1665



International Symbol Key:

**REF** Catalog Number

**IVD** *In Vitro* Diagnostic Medical Device

**LOT** Lot Information

Contains sufficient reagents

Temperature Limitation

Use By/Expiration Date

**CE** CE Symbol

Caution, consult

## **C. difficile Toxin/Antitoxin Kit**

### **INTENDED USE**

The *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin Kit is intended for use in conjunction with the tissue culture cytotoxicity assay for the confirmation of *Clostridium difficile* toxin in patient specimens. The kit includes a toxin control reagent and a specific *C. difficile* antitoxin for use in a tissue culture assay. The test is to be used as an aid in the diagnosis of *C. difficile* disease and results should be considered in conjunction with the patient history.

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

### **EXPLANATION**

*Clostridium difficile* is a major nosocomial pathogen that causes virtually all cases of pseudomembranous colitis and many cases of antibiotic-associated diarrhea (1). Its role as a major enteropathogen became apparent in the late 1970's when the results from a number of laboratories showed that (i) *C. difficile* could be isolated from patients with pseudomembranous colitis, (ii) the isolates produced the same cytotoxic (i.e., rounding) effect as that seen in fecal specimens from the patients, and (iii) the isolates produced a similar type of gastrointestinal disease in hamsters treated with antibiotics. The disease caused by *C. difficile* is due to the toxins that it produces. There are two toxins, toxin A and toxin B, that are involved in the disease. Toxin A is a potent enterotoxin and is lethal for experimental animals and cytotoxic for tissue culture cells. Toxin B is also lethal and cytotoxic for cells. Toxin B is often referred to as the cytotoxin because it is much more cytotoxic than toxin A on most tissue culture cells. It is this potent cytotoxic or rounding activity that has resulted in the use of toxin B as a marker for *C. difficile* toxin in fecal specimens. However, because of the enterotoxic activity of toxin A in the intestine, it is believed that toxin A causes most of the symptoms associated with the disease (2,3). This does not rule out a role for toxin B since there is evidence suggesting a synergistic action between the toxins.

The actual discovery of *C. difficile* toxin in fecal specimens from patients with pseudomembranous colitis (PMC) was due to the use of the tissue culture assay. In the mid-to-late 1970's, clinical investigators noted the presence of a cytotoxic or rounding activity in patients with PMC and subsequently discovered that the cytotoxic effect was neutralized by gas gangrene antitoxin. Further research led to the discovery that *C. sordellii* antitoxin neutralized the activity, leading scientists to suspect *C. sordellii* as the etiologic agent. However, carefully performed studies that followed these discoveries identified *C. difficile* as the cause of the disease. The neutralizing activity of the *C. sordellii* antitoxin was ultimately shown to occur because certain toxigenic strains of this organism produce toxins (toxin HT and toxin LT) that are very similar to toxins A and B of *C. difficile*. Thus, *C. sordellii* antitoxin contains cross reacting antibodies that neutralize the toxins of *C. difficile*.

The toxins of *C. difficile* are the largest bacterial toxins known. Toxins A and B have molecular weights of 308,000 and 279,000, respectively. Both toxins have a series of repeating units at the COOH-terminus of the molecule. The repeating units on the toxin A molecule are the binding portion that recognizes the carbohydrate receptors. The toxins have about 45% overall similarity in their amino acid sequence (4,5). This observation and the fact that the toxins elicit the same effect on tissue culture cells suggests that the toxins have the same mechanism of action. The genes for the toxins are located approximately 1 kb apart with a small open-reading frame located between them. Most toxigenic strains of *C. difficile* either produce both toxins or neither toxin, although recently, toxin A negative/toxin B positive strains have been identified (6-8).

There are four methods currently used for the detection of *C. difficile* and its toxins in fecal specimens. These include (i) isolation of the organism, (ii) antigen detection, (iii) tissue culture assay, and (iv) ELISA for the detection of toxin. Isolation of the organism and antigen detection are useful for detecting the presence of the organism in fecal

specimens. However, neither of these tests demonstrates the presence of toxin. This has to be done using either the tissue culture test or an ELISA specific for the toxins. The tissue culture procedure has proved to be very useful because of the high activity of *C. difficile* toxin B in the assay. As little as one picogram of the toxin is sufficient to cause a positive reaction. Neutralization of the cytotoxic activity by *C. difficile* antitoxin confirms the presence of *C. difficile* toxin. The assay is to be used as an aid in the diagnosis of *C. difficile* disease and test results must be considered in conjunction with the patient history. This is due to the fact that some adults are asymptomatic carriers and can have detectable levels of toxin in their feces but have no clinical symptoms. In addition, up to 50% of healthy infants can have *C. difficile* toxin in their feces but show no signs of illness. Therefore, it is important that test results be considered in light of the patient history.

### PRINCIPLE OF THE TEST

Two reagents are provided in the *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin Kit. One is the toxin control reagent to be used as the positive control material. The other is specific *C. difficile* antitoxin and is used to confirm the presence of *C. difficile* toxin by neutralizing the cytotoxic activity. For the assay, dilutions of the toxin control reagent are prepared and mixed either with buffer or diluted antitoxin. In addition, an extract of the clinical specimen is prepared and dilutions of the extract are prepared. The extract dilutions are then mixed either with buffer or diluted antitoxin. After an incubation period, an aliquot of each mixture is transferred to a microtiter well or tube containing a monolayer of tissue culture cells. In the presence of *C. difficile* toxin, the cells show a characteristic rounding effect. The toxin control reagent is used to demonstrate this effect and to show that the effect is neutralized by the *C. difficile* antitoxin. If the dilutions of specimen extract show a rounding effect and the effect is neutralized by the *C. difficile* antitoxin, the presence of *C. difficile* toxin is confirmed.

### MATERIALS PROVIDED

1. **T3000** Lyophilized *C. difficile* toxin control reagent - 1 mL (cytotoxic titer of  $>10^4$ )
2. **T1000** Lyophilized *C. difficile* antitoxin - 3 mL (prepared in goats)

### MATERIALS NOT PROVIDED

Test tubes for preparing dilutions	Pipettes/pipettor
Centrifuge	Sterile filters for preparing extracts
Tissue culture cells	Phosphate buffered saline (PBS)
Incubator	Microscope for observing cells

### PRECAUTIONS

1. Use fecal specimens within 24 hours of collection to obtain optimal results. Specimens that are frozen ( $-20^{\circ}\text{C}$  or lower) may lose activity due to freezing and thawing. AVOID REPEATED CYCLES OF FREEZING AND THAWING THE SPECIMEN. THIS MAY INACTIVATE THE TOXIN.
2. All specimens should be considered as potentially infectious and should be handled appropriately.
3. The toxin control reagent contains biologically active toxin and should be treated with caution. The antitoxin does not pose any known hazard.
4. Do not use the reagents beyond their expiration dates.
5. Keep reagents stored according to the manufacturer's recommendations. This prolongs the shelf-life of the reagents.
6. Place reagents back in refrigerator once the procedure has been completed.

### COLLECTION AND HANDLING OF FECAL SPECIMENS

**NOTE:** Standard collection and handling procedures used in-house are appropriate. Specimens should be transported as soon as possible and stored between  $2^{\circ}$  and  $8^{\circ}\text{C}$ . Whenever possible, test fecal specimens that are less than 24 hours old. Store

specimens at -20°C, or lower, if the test cannot be performed within 48 hours. FREEZING AND THAWING OF THE SPECIMEN, ESPECIALLY MULTIPLE TIMES, MAY RESULT IN LOSS OF ACTIVITY DUE TO DEGRADATION OF THE TOXIN. Make sure that specimens are thoroughly mixed (vortexed) prior to performing the assay. This includes complete mixing of the specimen prior to preparing the fecal extract.

#### PROCEDURE

**NOTE:** The procedure described below may be used for detecting *C. difficile* toxin in fecal specimens with the *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin Kit (8). Alternatively, the kit may be used according to other modified in-house procedures. It is important, however, that the toxin control reagent and the *C. difficile* antitoxin be used according to the instructions. Once the toxin control reagent and the antitoxin reagent have been reconstituted, aliquot the reagents in small volumes (50 to 100 µL) and freeze the undiluted aliquots. Airtight vials should be used to prevent dehydration of the aliquotted toxin and antitoxin. Do not freeze the **diluted** toxin control reagent or the diluted antitoxin reagent. Thaw and use undiluted aliquots of each reagent as needed.

#### PREPARATION OF CONTROLS AND FECAL FILTRATES

1. TOXIN CONTROL REAGENT. Add 1 mL sterile distilled water to lyophilized toxin control reagent. Aliquot small volumes (50 to 100 µL) of the undiluted reagent and store the unused aliquots at -20°C or lower in a freezer that is not self-defrosting. To further minimize dehydration of the undiluted aliquots, airtight vials should be used. To use the toxin control reagent, prepare tenfold dilutions ( $10^1$  to  $10^5$ ) in sterile PBS.
2. ANTITOXIN REAGENT. Add 3 mL sterile distilled water to the lyophilized antitoxin reagent. Aliquot small volumes (50 to 100 µL) of the undiluted reagent and store the unused aliquots at -20°C or lower. To use the antitoxin reagent, prepare a 1:25 dilution with sterile PBS.
3. FECAL FILTRATE. Use undiluted fecal specimen for watery samples or dilute 1:1 with sterile PBS. Centrifuge the specimen at 10,000 x g for 10 minutes and filter the supernatant fluid through a 0.45 µm membrane. Prepare tenfold dilutions ( $10^1$  to  $10^5$ ) in sterile PBS.

#### PERFORMING THE ASSAY IN MICROTITER WELLS

(Mix all reagents thoroughly before using or dispensing. Mixtures may be prepared in sterile microtiter wells or test tubes)

1. Mix 1 part (0.1 mL) of each dilution of the toxin control reagent with 1 part (0.1 mL) of sterile PBS. This series represents the positive control and demonstrates the characteristic cell rounding caused by *C. difficile* toxin.
2. Mix 1 part (0.1 mL) of each dilution of toxin control with 1 part (0.1 mL) of the diluted antitoxin. This series represents the antitoxin control and demonstrates the neutralization of *C. difficile* toxin by the antitoxin.
3. Mix 1 part (0.1 mL) of each dilution of fecal filtrate with 1 part (0.1 mL) of sterile PBS. This series will detect the presence of cytotoxic activity (i.e., cell rounding) in the fecal specimen.
4. Mix 1 part (0.1 mL) of each dilution of fecal filtrate with 1 part (0.1 mL) of diluted antitoxin. This series will confirm the presence of *C. difficile* toxin if the cytotoxic activity is neutralized by the antitoxin.
5. Incubate the mixtures for 30 minutes at room temperature.
6. Using a micropipette and new tips for each dilution, add 20 µL of each test mixture to microtiter wells containing cell monolayers. Incubate the wells overnight (18 hours) at  $37^\circ \pm 2^\circ\text{C}$  under conditions that are appropriate for the tissue cultured cells used in the assay. Many cell lines require  $\text{CO}_2$  and a humid atmosphere. Other cell lines perform adequately in HEPES-buffered media and do not require  $\text{CO}_2$ . Observe the condition of the cells. A positive reaction is noted by the rounding of the cells.

## PERFORMING THE ASSAY IN CULTURE TUBES

(Mix all reagents thoroughly before using or dispensing. Mixtures should be prepared in sterile test tubes)

1. Mix 1 part (0.2 mL) of each dilution of the toxin control reagent with 1 part (0.2 mL) of sterile PBS. This series represents the positive control and demonstrates the characteristic cell rounding caused by *C. difficile* toxin.
2. Mix 1 part (0.2 mL) of each dilution of toxin control with 1 part (0.2 mL) of the diluted antitoxin. This series represents the antitoxin control and demonstrates the neutralization of *C. difficile* toxin by the antitoxin.
3. Mix 1 part (0.2 mL) of each dilution of fecal filtrate with 1 part (0.2 mL) of sterile PBS. This series will detect the presence of cytotoxic activity (i.e., cell rounding) in the fecal specimen.
4. Mix 1 part (0.2 mL) of each dilution of fecal filtrate with 1 part (0.2 mL) of diluted antitoxin. This series will confirm the presence of *C. difficile* toxin if the cytotoxic activity is neutralized by the antitoxin.
5. Incubate the mixtures for 30 minutes at room temperature.
6. Using a sterile pipette for each control and specimen filtrate, add sufficient volumes of each test mixture to culture tubes containing cell monolayers to achieve a 1/10 dilution. For example, add 0.2 mL of mixture to a tube containing 1.8 mL. Replace caps on inoculated culture tubes. Incubate the wells overnight (18 hours) at  $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  under conditions that are appropriate for the tissue cultured cells used in the assay. Many cell lines require  $\text{CO}_2$  and a humid atmosphere. Other cell lines perform adequately in HEPES-buffered media and do not require  $\text{CO}_2$ . Observe the condition of the cells. A positive reaction is noted by the rounding of the cells.

## QUALITY CONTROL

A positive and negative control must be run with each series of test specimens. This includes the toxin control reagent mixed with buffer as a positive control and the toxin control reagent mixed with antitoxin to demonstrate neutralization of the cytotoxic activity. The positive control should show the typical rounding effect characteristic of *C. difficile* toxin. The test results are not valid unless these performance characteristics are met. If the performance characteristics are not met, please call Technical Services, and do not report test results.

Upon arrival, the kit should be inspected to ensure that components arrived in satisfactory condition. Each vial should be examined for the presence of a lyophilized powder. Test results along with control results should be recorded and reported according to in-house procedures and this information should be stored according to in-house procedures for future reference.

## INTERPRETATION AND REPORTING RESULTS

Dilutions of toxin control reagent mixed with buffer should show cell rounding out to the last or next-to-last dilution. Dilutions of toxin control reagent mixed with antitoxin should be neutralized through the  $10^4$  dilution +/- one dilution. In mixtures containing dilutions of fecal filtrate plus buffer, cell rounding indicates the presence of cytotoxic activity. If this activity is neutralized in dilutions of fecal filtrate plus antitoxin, the presence of *C. difficile* toxin is confirmed.

Specimens that contain cytotoxic activity which is neutralized by *C. difficile* antitoxin should be reported as "Positive for *C. difficile* toxin". Specimens that do not contain cytotoxic activity should be reported as "Negative for *C. difficile* toxin". Specimens that cause cell rounding which is not neutralized by *C. difficile* antitoxin should be reported as "Cytotoxic activity is present but is not characteristic of *C. difficile* toxin".

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin Kit is used to detect *C. difficile* toxin in fecal specimens. Detection of the toxin is dependent on the biological activity of the

toxin. Specimens must be handled properly and stored as recommended to minimize inactivation of the toxin.

2. Some specimens may give reactions that are inconclusive (e.g., partial rounding of the cells, stretching instead of rounding). Under these conditions, the specimen should be retested or a fresh specimen should be tested. Additional tests that may be used in conjunction with the *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin Kit include the ELISA for toxin, isolation of the organism on selective media, or antigen detection.
3. Certain isolates of *Clostridium sordellii* produce the same type of rounding on tissue culture cells as toxigenic *Clostridium difficile*, due to the similarities of the *C. sordellii* toxins and the *C. difficile* toxins. *Clostridium sordellii* has not been detected in patients with antibiotic associated-diarrhea and colitis. It is unlikely that *C. sordellii* will be present in human fecal specimens.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In a study performed in-house at TECHLAB<sup>®</sup>, Inc., of 100 specimens submitted from a previous *C. difficile* study, 87 were positive for cytotoxic activity. All 87 were confirmed positive for TECHLAB<sup>®</sup> *C. difficile* toxin using *C. sordellii* antitoxin from the U.S. Bureau of Biologics and by the *C. difficile* antitoxin. Therefore, the *C. difficile* antitoxin showed a sensitivity and specificity of 100% compared to *C. sordellii* antitoxin. The predictive positive and negative values and the correlation with the use of *C. sordellii* antitoxin also were 100%.

In another study at a Midwestern VA medical center, of 85 specimens submitted for *C. difficile* testing, 20 were confirmed positive for *C. difficile* toxin using *C. sordellii* antitoxin whereas 19 were confirmed positive by the *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin Kit. The one specimen that was positive with the *C. sordellii* antitoxin and negative with the *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin Kit was only weakly positive. In this study, the sensitivity and specificity were 95% and 100%, respectively. The predictive positive and negative values were 100% and 98.5%, respectively, and the correlation was 98.8%.

Overall, the sensitivity and specificity of the *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin Kit was 99.2% and 100%, respectively, compared with *C. sordellii* antitoxin. The predictive positive and negative values were 100% and 98.8%, respectively, and the overall correlation was 99.5%.

## EXPECTED VALUES

In a study in which specimens were analyzed in-house at TECHLAB<sup>®</sup>, Inc., the prevalence of a positive tissue culture assay in specimens actually submitted to the clinical laboratory was about 20%. In the study at the Midwestern VA medical center, the prevalence was 23.5%. The prevalence will vary from location to location and hospitals may experience rates lower or higher than those observed at this particular site. *Clostridium difficile* disease is primarily a nosocomial disease of elderly patients and hospitals that have higher numbers of elderly patients may experience higher rates. It is important to consider any test results in conjunction with clinical symptoms since some healthy adults and large numbers of healthy infants (up to 50%) will be positive for *C. difficile* toxin. In addition, *C. difficile* carriage rates of 22% to 32% have been reported in cystic fibrosis patients (10-12).

## CROSS-REACTIVITY

Toxic filtrates from *C. chauveoi*, *C. fallax*, *C. perfringens*, *C. septicum*, and *C. spiroforme* were not neutralized by the TECHLAB<sup>®</sup> *C. difficile* antitoxin. In addition, alpha-toxin from *C. perfringens*, collagenase and clostripain from *C. histolyticum*, cholera toxin, diphtheria toxin, shiga-like toxin, and staphylococcal enterotoxin were not neutralized by the antitoxin. The only organism that is known to cross-react in the *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin Kit is *C. sordellii*. Certain toxigenic isolates of *C. sordellii* produce toxins that are very similar to the toxins of *C. difficile*. The hemorrhagic toxin (toxin HT) of *C. sordellii* is very similar to toxin A whereas the lethal toxin

(toxin LT) is very similar to toxin B. Antibodies against the *C. difficile* toxins neutralize the toxins HT and LT of *C. sordellii*, and antibodies against toxins HT and LT neutralize toxins A and B. It should be emphasized that *C. sordellii* has not been implicated in antibiotic-associated diarrhea and colitis.

#### REPRODUCIBILITY AND PRECISION

Identical set of five fecal specimens were sent from TECHLAB®, Inc. to three different laboratories for analysis with the *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin Kit. One laboratory was located on the east coast and the other two laboratories were located in the Midwest. The test results from each laboratory were consistent with the test results obtained in-house at TECHLAB®, Inc. In an in-house study, ten positive fecal specimens were assayed at time 0, 24, 48, and 72 hours using the *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin Kit. These specimens were shown to be consistently positive for *C. difficile* toxin at each of the time intervals, as determined by neutralization of the cytotoxic activity. It should be noted that the specimens were stored at 4°C during the testing period and that in some fecal specimens, the cytotoxic activity is not stable and will decrease upon incubation at 4°C. In additional in-house studies, three different lots of the positive control reagent were tested in duplicate and consistently gave cytotoxic titers of 10<sup>4</sup> or higher. Further evaluation demonstrated that five different lots of the *C. difficile* antitoxin consistently neutralized the dilutions of positive control reagent.

FOR INFORMATIONAL USE ONLY



## Kit de toxina/antitoxina de *Clostridium difficile* - ESPAÑOL

### USO PREVISTO

El Kit de toxina/antitoxina de *Clostridium difficile* está indicado para su uso junto con el análisis de citotoxicidad de cultivos tisulares para la confirmación de la presencia de la toxina de *Clostridium difficile* en muestras clínicas. El kit incluye un reactivo de control de la toxina y un reactivo de antitoxina de *C. difficile* específica para su uso en un análisis de cultivo tisular. La prueba debe utilizarse como ayuda para el diagnóstico de la enfermedad causada por *C. difficile* y los resultados deben evaluarse junto con la historia clínica del paciente.

### PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.

### FUNDAMENTO

*Clostridium difficile* es un patógeno hospitalario importante que causa prácticamente todos los casos de colitis pseudomembranosa y muchos casos de diarrea asociada a antibióticos (1). Su implicación como enteropatógeno importante se hizo evidente a finales del decenio de 1970, cuando los resultados de diversos laboratorios mostraron lo siguiente: (i) podía aislarse *C. difficile* en pacientes con colitis pseudomembranosa, (ii) las cepas aisladas producían el mismo efecto citotóxico (redondeo) observado en las muestras fecales de los pacientes, y (iii) las cepas aisladas producían un tipo similar de enfermedad gastrointestinal en hámsteres tratados con antibióticos. La enfermedad causada por *C. difficile* está originada por las toxinas que produce el microorganismo. Hay dos toxinas, A y B, implicadas en la enfermedad. La toxina A es una enterotoxina potente que es letal para los animales de experimentación y citotóxica para las células de cultivos tisulares. La toxina B también es letal y citotóxica. La toxina B a menudo recibe el nombre de citotoxina debido a que es mucho más citotóxica que la toxina A sobre la mayoría de las células de cultivos tisulares. Esta potente actividad citotóxica o de redondeo ha conducido al uso de la toxina B como marcador de la toxina de *C. difficile* en muestras fecales. Sin embargo, debido a la actividad enterotóxica de la toxina A en el intestino, se cree que la toxina A causa la mayoría de los síntomas asociadas a la enfermedad (2,3). Esto no descarta la implicación de la toxina B, ya que se dispone de datos que sugieren una acción sinérgica entre las toxinas.

El descubrimiento real de la toxina de *C. difficile* en muestras fecales de pacientes con colitis pseudomembranosa (CSM) se debió al uso del análisis de cultivos tisulares. Entre mediados y finales del decenio de 1970, varios investigadores clínicos detectaron la presencia de una actividad citotóxica o de redondeo en pacientes con CSM y posteriormente descubrieron que el efecto citotóxico se neutralizaba con la antitoxina de la gangrena gaseosa. Investigaciones subsiguientes condujeron al descubrimiento de que la antitoxina de *C. sordellii* neutralizaba la actividad, lo cual llevó a los científicos a sospechar que *C. sordellii* era el agente etiológico. Sin embargo, diversos estudios meticulosos realizados después de estos descubrimientos identificaron *C. difficile* como causa de la enfermedad. Posteriormente se demostró que la actividad neutralizante de la antitoxina de *C. sordellii* se debía a que ciertas cepas toxígenas de este microorganismo producen toxinas (toxina HT y toxina LT) muy similares a las toxinas A y B de *C. difficile*. Por este motivo, la antitoxina de *C. sordellii* contiene anticuerpos con reactividad cruzada que neutralizan las toxinas de *C. difficile*.

Las toxinas de *C. difficile* son las toxinas bacterianas de mayor tamaño que se conoce. Las toxinas A y B tienen un peso molecular de 308.000 y 279.000, respectivamente. Ambas toxinas tienen una serie de unidades repetidas en el extremo COOH de la molécula. Las unidades repetidas de la molécula de la toxina A son el fragmento de unión que reconoce los receptores glucídicos. Las toxinas tienen una semejanza global próxima al 45% en su secuencia de aminoácidos (4,5). Esta observación y el hecho de que las toxinas provocan el mismo efecto sobre las células de cultivos tisulares sugieren que las toxinas tienen el mismo mecanismo de acción.



Los genes de las toxinas están situados con una separación aproximada de 1 kb, con un pequeño marco de lectura abierto entre ellos. La mayoría de las cepas toxígenas de *C. difficile* produce ambas toxinas o no produce ninguna toxina, aunque recientemente se han identificado cepas que sólo producen la toxina B (6-8).

Actualmente se utilizan cuatro métodos para la detección de *C. difficile* y sus toxinas en muestras fecales: (i) aislamiento del microorganismo, (ii) detección de antígenos, (iii) análisis de cultivos tisulares y (iv) ELISA para la detección de las toxinas. El aislamiento del microorganismo y la detección de antígenos son útiles para detectar la presencia del microorganismo en muestras fecales. Sin embargo, ninguna de estas pruebas demuestra la presencia de la toxina. Para demostrar la presencia de la toxina se requiere el uso del análisis de cultivos tisulares o un ELISA específico para las toxinas. La técnica de cultivos tisulares ha demostrado ser muy útil debido a la alta actividad de la toxina B de *C. difficile* en el análisis. Basta un picogramo de la toxina para causar una reacción positiva. La neutralización de la actividad citotóxica por la antitoxina de *C. difficile* confirma la presencia de la toxina de *C. difficile*. El análisis debe utilizarse como ayuda para el diagnóstico de la enfermedad causada por *C. difficile* y los resultados deben evaluarse junto con la historia clínica del paciente. La razón es que algunos adultos son portadores asintomáticos y pueden tener niveles detectables de la toxina en las heces pero no presentar síntomas clínicos. Además, hasta un 50% de los lactantes sanos puede tener la toxina de *C. difficile* en las heces y no mostrar signos de la enfermedad. Por consiguiente, es importante evaluar los resultados de la prueba junto con la historia clínica del paciente.

#### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

En el Kit de toxina/antitoxina de *Clostridium difficile* se incluyen dos reactivos. Uno es el reactivo de control de la toxina que se utiliza como material de control positivo. El otro es la antitoxina de *C. difficile* específica que se utiliza para confirmar la presencia de la toxina de *C. difficile* mediante la neutralización de la actividad citotóxica. Para el análisis se preparan diluciones del reactivo de control de la toxina que se mezclan con tampón o antitoxina diluida. Además, se preparan un extracto de la muestra clínica y diluciones del extracto. A continuación se mezclan las diluciones del extracto con tampón o antitoxina diluida. Después de un período de incubación, se transfiere una porción de cada mezcla a un tubo o pocillo de microtitulación que contiene una monocapa de células de cultivo tisular. En presencia de la toxina de *C. difficile*, las células muestran un efecto característico de redondeo. El reactivo de control de la toxina se utiliza para demostrar este efecto y mostrar que es neutralizado por la antitoxina de *C. difficile*. Si las diluciones del extracto de la muestra muestran un efecto de redondeo y éste es neutralizado por la antitoxina de *C. difficile*, se confirma la presencia de la toxina de *C. difficile*.

#### MATERIALES PROVISTOS

1. **T3000** Reactivo de control de la toxina de *C. difficile* liofilizado: 1 mL (título de citotoxicidad de  $> 10^4$ )
2. **T1000** Reactivo de antitoxina de *C. difficile* liofilizado: 3 ml (de cabra)

#### MATERIALES NO PROVISTOS

Tubos de ensayo para preparar las diluciones Pipetas

Centrífuga

Filtros estériles para preparar los extractos

Células de cultivo tisular

Solución salina tamponada con fosfato (PBS)

Incubadora

Microscopio para observar las células

#### PRECAUCIONES

1. Las muestras fecales deben analizarse en un plazo no superior a 24 horas desde su recogida para obtener resultados óptimos. En las muestras congeladas ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ) puede perderse la actividad de la toxina por los procesos de congelación y descongelación. DEBEN EVITARSE CICLOS REPETIDOS DE CONGELACIÓN Y

DESCONGELACIÓN DE LA MUESTRA. ESTE PROCESO PODRÍA INACTIVAR LA TOXINA.

2. Todas las muestras deben considerarse potencialmente infecciosas y deben manipularse como tales.
3. El reactivo de control de la toxina contiene la toxina biológicamente activa y debe tratarse con precaución. La antitoxina no tiene ningún riesgo conocido.
4. Los reactivos no deben utilizarse después de la fecha de caducidad.
5. Los reactivos deben conservarse de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Esto prolongará su período de validez.
6. Los reactivos deben guardarse en el frigorífico una vez finalizado el procedimiento.

### RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS FECALES

**NOTA:** Los procedimientos internos estándar habituales de recogida y transporte son adecuados. Las muestras deben transportarse lo antes posible y conservarse a una temperatura de 2 a 8 °C. Siempre que sea posible, las muestras fecales deben procesarse en las 24 horas posteriores a su recogida. Las muestras deben conservarse a una temperatura igual o inferior a -20 °C si la prueba no puede realizarse en las 48 horas siguientes a la recogida de la muestra. LA CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LA MUESTRA, SOBRE TODO CUANDO SE REALIZA VARIAS VECES, PUEDE CAUSAR LA PÉRDIDA DE ACTIVIDAD POR LA DEGRADACIÓN DE LA TOXINA. Es preciso asegurarse de que las muestras estén completamente mezcladas (con el vórtex) antes de realizar el análisis. Esto incluye la mezcla completa de la muestra antes de la preparación del extracto fecal.

### PROCEDIMIENTO

**NOTA:** El procedimiento descrito a continuación puede utilizarse para detectar la toxina de *C. difficile* en muestras fecales con el Kit de toxina/antitoxina de *Clostridium difficile* (8). Este kit también puede utilizarse de acuerdo con otros procedimientos internos modificados. No obstante, es importante que el reactivo de control de la toxina y la antitoxina de *C. difficile* se utilicen de acuerdo con las instrucciones. Una vez reconstituidos el reactivo de control de la toxina y el reactivo de antitoxina, divida los reactivos en volúmenes pequeños (50 a 100 µL) y congele las porciones no diluidas. Deben utilizarse viales herméticos para evitar la deshidratación de la toxina y la antitoxina. No congele **diluidos** el reactivo de control de la toxina ni el reactivo de antitoxina. Descongele y use porciones no diluidas de cada reactivo según sea necesario.

### PREPARACIÓN DE LOS CONTROLES Y LOS FILTRADOS FECALES

1. **REACTIVO DE CONTROL DE LA TOXINA.** Añadir 1 mL de agua destilada estéril al reactivo de control de la toxina liofilizado. Dividir volúmenes pequeños (50 a 100 µL) del reactivo sin diluir y conservar las porciones no utilizadas a una temperatura igual o inferior a -20 °C en un congelador sin función de autodescongelación. Deben utilizarse viales herméticos para reducir al mínimo la deshidratación de las porciones no diluidas. Para utilizar el reactivo de control de la toxina, preparar diluciones decimales ( $10^1$  a  $10^5$ ) en PBS estéril.
2. **REACTIVO DE ANTITOXINA.** Añadir 3 mL de agua destilada estéril al reactivo de antitoxina liofilizado. Dividir volúmenes pequeños (50 a 100 µL) del reactivo sin diluir y conservar las porciones no utilizadas a una temperatura igual o inferior a -20 °C. Para utilizar el reactivo de antitoxina, preparar una dilución 1:25 con PBS estéril.
3. **FILTRADO FECAL.** Utilizar la muestra fecal sin diluir en el caso de muestras acuosas o diluir 1:1 con PBS estéril. Centrifugar la muestra a 10.000 x g durante 10 minutos y filtrar el líquido sobrenadante a través de una membrana de 0.45 µm. Preparar diluciones decimales ( $10^1$  a  $10^5$ ) en PBS estéril.

### REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS EN POCILLOS DE MICROTITULACIÓN

(Mezclar bien todos los reactivos antes de usarlos o dispensarlos. Las mezclas pueden prepararse en pocillos de microtitulación o en tubos de ensayo estériles.)

1. Mezclar 1 parte (0.1 mL) de cada dilución del reactivo de control de la toxina con 1 parte (0.1 mL) de PBS estéril. Esta serie representa el control positivo y muestra el redondeo característico de las células causado por la toxina de *C. difficile*.
2. Mezclar 1 parte (0.1 mL) de cada dilución del reactivo de control de la toxina con 1 parte (0.1 mL) de la antitoxina diluida. Esta serie representa el control de antitoxina y muestra la neutralización de la toxina de *C. difficile* por la antitoxina.
3. Mezclar 1 parte (0.1 mL) de cada dilución del filtrado fecal con 1 parte (0.1 mL) de PBS estéril. Esta serie detectará la presencia de actividad citotóxica (redondeo de las células) en la muestra fecal.
4. Mezclar 1 parte (0.1 mL) de cada dilución del filtrado fecal con 1 parte (0.1 mL) de antitoxina diluida. Esta serie confirmará la presencia de la toxina de *C. difficile* si la antitoxina neutraliza la actividad citotóxica.
5. Incubar las mezclas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Utilizando una micropipeta y puntas nuevas para cada dilución, añadir 20 µL de cada mezcla problema a pocillos de microtitulación que contienen monocapas de células. Incubar los pocillos hasta el día siguiente (18 horas) a  $37 \pm 2$  °C en condiciones adecuadas para las células de cultivo tisular utilizadas en el análisis. Muchas líneas celulares requieren CO<sub>2</sub> y una atmósfera húmeda. Para otras líneas celulares que no requieren CO<sub>2</sub> son adecuados los medios de cultivo tamponados con HEPES. Observe el estado de las células.  
El redondeo de las células indica una reacción positiva.

#### REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS EN TUBOS DE CULTIVO

(Mezclar bien todos los reactivos antes de usarlos o dispensarlos. Las mezclas pueden prepararse en tubos de ensayo estériles.)

1. Mezclar 1 parte (0.2 mL) de cada dilución del reactivo de control de la toxina con 1 parte (0.2 mL) de PBS estéril. Esta serie representa el control positivo y muestra el redondeo característico de las células causado por la toxina de *C. difficile*.
2. Mezclar 1 parte (0.2 mL) de cada dilución del reactivo de control de la toxina con 1 parte (0.2 mL) de la antitoxina diluida. Esta serie representa el control de antitoxina y muestra la neutralización de la toxina de *C. difficile* por la antitoxina.
3. Mezclar 1 parte (0.2 mL) de cada dilución del filtrado fecal con 1 parte (0.2 mL) de PBS estéril. Esta serie detectará la presencia de actividad citotóxica (redondeo de las células) en la muestra fecal.
4. Mezclar 1 parte (0.2 mL) de cada dilución del filtrado fecal con 1 parte (0.2 mL) de antitoxina diluida. Esta serie confirmará la presencia de la toxina de *C. difficile* si la antitoxina neutraliza la actividad citotóxica.
5. Incubar las mezclas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Utilizando una pipeta estéril para cada control y filtrado de la muestra, añadir volúmenes suficientes de cada mezcla problema a tubos de cultivo que contienen monocapas de células para conseguir una dilución de 1/10. Por ejemplo, añadir 0,2 mL de mezcla a un tubo que contenga 1.8 mL. Volver a colocar los tapones de los tubos de cultivo inoculados. Incubar los pocillos hasta el día siguiente (18 horas) a  $37 \pm 2$  °C en condiciones adecuadas para las células de cultivo tisular utilizadas en el análisis. Muchas líneas celulares requieren CO<sub>2</sub> y una atmósfera húmeda. Para otras líneas celulares que no requieren CO<sub>2</sub> son adecuados los medios de cultivo tamponados con HEPES. Observe el estado de las células. El redondeo de las células indica una reacción positiva.

#### CONTROL DE CALIDAD

Se efectuarán un control positivo y un control negativo con cada serie de muestras problema. Esto incluye el reactivo de control de la toxina mezclado con tampón como control positivo y el reactivo de control de la toxina mezclado con antitoxina para demostrar la neutralización de la actividad citotóxica. El control positivo debe mostrar el efecto de redondeo típico característico de la toxina de *C. difficile*. Los resultados del

análisis no son válidos a menos que se cumplan estas características de rendimiento. Si no se cumplen las características del rendimiento, llame al servicio técnico y no notifique los resultados del análisis.

A su recepción, debe inspeccionarse el kit para comprobar que los componentes han llegado en un estado satisfactorio. Deben examinarse todos los viales para comprobar la presencia de un polvo liofilizado. Los resultados del análisis, junto con los resultados de control, se registrarán y notificarán según los procedimientos internos y se conservarán según los procedimientos internos para futura referencia.

### INTERPRETACIÓN Y NOTIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS

Las diluciones del reactivo de control de la toxina mezclado con tampón deberían mostrar el redondeo de las células hasta la última o la penúltima dilución. Las diluciones del reactivo de control de la toxina con la antitoxina deberían mostrar neutralización hasta la dilución  $10^4 \pm 1$  dilución. En mezclas que contengan diluciones del filtrado fecal con tampón, el redondeo de las células indica la presencia de actividad citotóxica. Si esta actividad es neutralizada en las diluciones del filtrado fecal con antitoxina, se confirma la presencia de la toxina de *C. difficile*.

Las muestras que contengan actividad citotóxica neutralizada por la antitoxina de *C. difficile* deben clasificarse como "Positivas para la toxina de *C. difficile*". Las muestras que no muestren actividad citotóxica deben clasificarse como "Negativas para la toxina de *C. difficile*". Las muestras que causen un redondeo de las células que no es neutralizado por la antitoxina de *C. difficile* deben clasificarse como "Presencia de actividad citotóxica no característica de la toxina de *C. difficile*".

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El Kit de toxina/antitoxina de *Clostridium difficile* se utiliza para detectar la toxina de *C. difficile* en muestras fecales. La detección de la toxina depende de la actividad biológica de la toxina. Las muestras deben manipularse y conservarse correctamente de acuerdo con las recomendaciones para reducir al mínimo la inactivación de la toxina.
2. Algunas muestras pueden dar reacciones no concluyentes (por ejemplo, redondeo parcial de las células, estiramiento en lugar de redondeo). En estas condiciones, debe repetirse el análisis de la muestra o debe analizarse una muestra fresca. Otras pruebas que pueden utilizarse junto con el Kit de toxina/antitoxina de *Clostridium difficile* son ELISA para la toxina, el aislamiento del microorganismo en medios selectivos y la detección de antígenos.
3. Algunas cepas aisladas de *Clostridium sordellii* producen el mismo tipo de redondeo de las células de cultivos tisulares que causan las cepas toxigenas de *Clostridium difficile* debido a las semejanzas de las toxinas de *C. sordellii* y *C. difficile*. No se ha detectado *Clostridium sordellii* en pacientes con colitis y diarrea asociada a antibióticos. No es probable que *C. sordellii* esté presente en muestras fecales humanas.

### CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

En un estudio interno realizado en TECHLAB®, Inc., de 100 muestras enviadas de un estudio previo de *C. difficile*, 87 fueron positivas para actividad citotóxica. En las 87 muestras se confirmó la positividad para la toxina de *C. difficile* utilizando la antitoxina de *C. sordellii* del U.S. Bureau of Biologics y la antitoxina de *C. difficile* de TECHLAB®. Por consiguiente, la antitoxina de *C. difficile* de TECHLAB® mostró una sensibilidad y una especificidad del 100% en comparación con la antitoxina de *C. sordellii*. Los valores pronósticos positivos y negativos y la correlación con el uso de la antitoxina de *C. sordellii* también fueron del 100%.

En otro estudio realizado en un centro médico del medio-oeste de Virginia (Estados Unidos), de las 85 muestras enviadas para el análisis de *C. difficile*, en 20 de ellas se confirmó la positividad para la toxina de *C. difficile* utilizando la antitoxina de *C. sordellii* y en 19 de ellas se confirmó la positividad con el Kit de toxina/antitoxina de *Clostridium difficile*. La muestra que fue positiva con la antitoxina de *C. sordellii* y

negativa con el Kit de toxina/antitoxina de *Clostridium difficile* sólo mostró una positividad débil. En este estudio, la sensibilidad y la especificidad fueron del 95% y del 100%, respectivamente. Los valores pronósticos positivos y negativos fueron del 100% y del 98.5%, respectivamente, y la correlación fue del 98.8%.

En conjunto, la sensibilidad y la especificidad del Kit de toxina/antitoxina de *Clostridium difficile* fueron del 99.2% y del 100%, respectivamente, en comparación con la antitoxina de *C. sordellii*. Los valores pronósticos positivos y negativos fueron del 100% y del 98.8%, respectivamente, y la correlación global fue del 99.5%.

## VALORES ESPERADOS

En un estudio en el que se realizó un análisis interno de las muestras en TECHLAB®, Inc., la prevalencia de un análisis de cultivo tisular positivo en muestras enviadas al laboratorio clínico fue de aproximadamente el 20%. En el estudio realizado en el centro médico del medio-oeste de Virginia, la prevalencia fue del 23.5%. La prevalencia variará de un lugar a otro, y es posible que los hospitales presenten tasas inferiores o superiores a las observadas en ese centro. La enfermedad por *Clostridium difficile* es, sobre todo, una enfermedad hospitalaria que afecta a pacientes ancianos, y los hospitales con cifras elevadas de pacientes ancianos pueden presentar tasas más altas. Es importante evaluar cualquier resultado de un análisis junto con los síntomas clínicos, ya que en algunos adultos sanos y en un gran número de lactantes sanos (hasta el 50%) se obtienen resultados positivos para la toxina de *C. difficile*. Además, en pacientes con fibrosis quística se han descrito tasas de portadores de *C. difficile* de entre el 22% y el 32% (10-12).

## REACTIVIDAD CRUZADA

Los filtrados tóxicos de *C. chauveoi*, *C. fallax*, *C. perfringens*, *C. septicum* y *C. spiroforme* no se neutralizaron con la antitoxina de *C. difficile*. Además, la antitoxina tampoco neutralizó la toxina alfa de *C. perfringens*, la colagenasa y la clostripaina de *C. histolyticum*, la toxina colérica, la toxina diftérica, la toxina pseudohigélica ni la enterotoxina estafilocócica. El único microorganismo que se ha demostrado que presenta reactividad cruzada con el Kit de toxina/antitoxina de *Clostridium difficile* es *C. sordellii*. Ciertas cepas aisladas toxígenas de *C. sordellii* producen toxinas muy similares a las de *C. difficile*. La toxina hemorrágica (toxina HT) de *C. sordellii* es muy similar a la toxina A, mientras que la toxina letal (toxina LT) es muy similar a la toxina B. Los anticuerpos frente a las toxinas de *C. difficile* neutralizan las toxinas HT y LT de *C. sordellii*, y los anticuerpos frente a las toxinas HT y LT neutralizan las toxinas A y B. Debe resaltarse que no se ha relacionado *C. sordellii* con la colitis y la diarrea asociada a antibióticos.

## REPRODUCIBILIDAD Y PRECISIÓN

Se envió una serie idéntica de cinco muestras fecales desde TECHLAB®, Inc. a tres laboratorios diferentes para su análisis con el Kit de toxina/antitoxina de *Clostridium difficile*. Un laboratorio estaba en la costa este y los otros dos laboratorios estaban en el medio-oeste. Los resultados del análisis de los tres laboratorios coincidían los resultados obtenidos internamente en TECHLAB®, Inc. En un estudio interno, se analizaron diez muestras fecales positivas a las 0, 24, 48 y 72 horas utilizando el Kit de toxina/antitoxina de *Clostridium difficile*. Estas muestras presentaron una positividad homogénea para la toxina de *C. difficile* en todos los intervalos de tiempo determinada por la neutralización de la actividad citotóxica. Debe señalarse que las muestras se conservaron a 4 °C durante el período de análisis y que, en algunas muestras fecales, la actividad citotóxica no es estable y disminuye con la incubación a 4 °C. En otros estudios internos se analizaron por duplicado tres lotes diferentes del reactivo de control positivo y se obtuvieron valores homogéneos de citotoxicidad iguales o superiores a 10<sup>4</sup>. Un nuevo estudio demostró que cinco lotes diferentes de la antitoxina de *C. difficile* neutralizaron de manera homogénea las diluciones del reactivo de control positivo.

## ***Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin-Kit- DEUTSCH**

### **VERWENDUNGSZWECK**

Das *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin-Kit ist für die gemeinsame Verwendung mit dem Gewebekultur-Zytotoxizitätstest für den Nachweis von *Clostridium difficile*-Toxin in Patientenproben bestimmt. Das Kit enthält ein Toxinkontrollreagenz und ein spezifisches *C. difficile*-Antitoxin zur Verwendung in einem Gewebekulturtest. Der Test dient als Hilfsmittel bei der Diagnose einer *C. difficile*-assoziierten Erkrankung und seine Ergebnisse sind im Zusammenhang mit der Patientenanamnese zu betrachten. FÜR DIE *IN-VITRO*-DIAGNOSE.

### **ERLÄUTERUNG**

*Clostridium difficile* ist ein weit verbreiteter, nosokomialer Krankheitserreger, der praktisch für alle Fälle von pseudomembranöser Kolitis sowie zahlreiche Fälle von Antibiotika-assoziiierter Diarrhöe verantwortlich ist (1). Seine Rolle als häufiges Enteropathogen trat Ende der 70-er Jahre ans Licht, als Ergebnisse aus einer Reihe von Labors zeigten, dass (i) *C. difficile* aus Patienten mit pseudomembranöser Kolitis isoliert werden konnte, (ii) die Isolate dieselbe zytotoxische Wirkung (Rundung) aufwiesen wie die bei Stuhlproben der Patienten beobachtete, und (iii) die Isolate eine ähnliche Form von Magen-Darm-Erkrankung bei mit Antibiotika behandelten Hamstern verursachten. Die von *C. difficile* verursachte Erkrankung geht auf die von *C. difficile* gebildeten Toxine zurück. Zwei Toxine, Toxin A und Toxin B, sind an der Erkrankung beteiligt. Toxin A ist ein starkes, für Versuchstiere tödliches und Gewebekulturzellen zytotoxisches Enterotoxin. Toxin B ist ebenfalls tödlich und zytotoxisch für Zellen. Toxin B wird häufig als das Zytotoxin bezeichnet, da es auf die meisten Gewebekulturzellen eine weitaus stärkere zytotoxische Wirkung als Toxin A ausübt. Diese starke zytotoxische bzw. rundende Aktivität führte zur Verwendung von Toxin B als Marker für *C. difficile*-Toxin in Stuhlproben. Aufgrund der enterotoxischen Aktivität von Toxin A im Darm nimmt man jedoch an, dass die meisten der mit der Erkrankung assoziierten Symptome auf Toxin A zurückgehen (2,3). Dies schließt nicht aus, dass Toxin B ebenfalls eine Rolle spielt, da einige Fakten auf eine synergistische Wirkung der beiden Toxine untereinander hinweisen.

Die jüngste Entdeckung von *C. difficile*-Toxin in Stuhlproben von Patienten mit pseudomembranöser Kolitis (PMC) ergab sich aus der Verwendung des Gewebekulturtests. Mitte bis Ende der 70-er Jahre beobachteten klinische Forscher eine zytotoxische bzw. rundende Aktivität bei Patienten mit PMC und schlussfolgerten daraus, dass die zytotoxische Wirkung mittels Gasgangrän-Antitoxin neutralisiert wurde. Weitere Forschungen führten zu der Erkenntnis, dass die Aktivität durch *C. sordellii*-Antitoxin neutralisiert wurde und ließ die Wissenschaftler vermuten, dass *C. sordellii* der Krankheitserreger ist. Sorgfältig durchgeführte Studien, die auf diese Entdeckungen folgten, identifizierten jedoch *C. difficile* als Ursache der Erkrankung. Letztendlich stellte sich heraus, dass die neutralisierende Wirkung des *C. sordellii*-Antitoxins darauf zurückzuführen ist, dass bestimmte toxische Stämme dieses Organismus Toxine (HT und LT) bilden, die große Ähnlichkeit mit den *C. difficile*-Toxinen A und B aufweisen.

Die *C. difficile*-Toxine sind die größten bekannten Bakterientoxine. Toxin A und B haben eine Molmasse von 308.000 bzw. 279.000. Beide Toxine weisen eine Serie an sich wiederholenden Einheiten am COOH-Terminus des Moleküls auf. Die sich wiederholenden Einheiten auf dem Toxin A-Molekül sind jener Bindungsteil, der die Kohlenhydratrezeptoren erkennt. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz dieser Toxine liegt insgesamt bei 45% (4,5). Diese Feststellung sowie die Tatsache, dass die Toxine denselben Wirkungsmechanismus haben. Die Gene für die Toxine liegen ca. 1 kb auseinander, mit einem kleinen offenen Leseraster dazwischen. Die meisten toxischen *C. difficile*-Stämme bilden entweder beide Toxine oder keines. Kürzlich wurden jedoch auch Toxin A-negative/Toxin B-positive Stämme identifiziert (6-8).



Derzeit werden vier Verfahren für den Nachweis von *C. difficile* und seine Toxine in Stuhlproben angewandt. Diese sind (i) Isolierung des Organismus, (ii) Antigennachweis, (iii) Gewebekulturtest sowie (iv) ELISA für den Nachweis von Toxin. Die Isolierung des Organismus und der Antigennachweis sind für den Nachweis des Organismus in Stuhlproben hilfreich. Keines dieser Testverfahren zeigt jedoch das Vorhandensein von Toxin auf. Dazu müssen entweder ein Gewebekulturtest oder ein toxinspezifisches ELISA durchgeführt werden. Der Gewebekulturtest hat sich aufgrund der hohen Aktivität von *C. difficile* Toxin B als äußerst hilfreiches Verfahren erwiesen. Bereits ein Pikogramm Toxin reicht für eine positive Reaktion aus. Eine Neutralisierung der zytotoxischen Aktivität durch *C. difficile*-Antitoxin bestätigt das Vorhandensein von *C. difficile*-Toxin. Der Test dient als Hilfsmittel bei der Diagnose einer *C. difficile*-assoziierten Erkrankung und seine Ergebnisse sind im Zusammenhang mit der Patientenanamnese zu betrachten. Grund dafür ist die Tatsache, dass einige Erwachsene asymptomatische Träger sind und nachweisbare Toxinkonzentrationen im Stuhl haben können, dabei jedoch keinerlei klinische Symptome aufweisen. Zudem kann bei zahlreichen gesunden Kleinkindern (bis zu 50%) *C. difficile*-Toxin im Stuhl vorhanden sein, ohne dass diese Krankheitszeichen aufweisen. Daher sind die Testergebnisse unbedingt im Zusammenhang mit der Patientenanamnese zu betrachten.

### TESTPRINZIP

Zwei Reagenzien sind im *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin-Kit enthalten: das als positive Kontrolle verwendete Toxinkontrollreagenz und ein spezifisches *C. difficile*-Antitoxin zur Bestätigung des Vorhandenseins von *C. difficile*-Toxin mittels Neutralisierung der zytotoxischen Aktivität. Für den Test werden Verdünnungen des Toxinkontrollreagenzes vorbereitet und mit Puffer oder verdünntem Antitoxin gemischt. Zudem werden ein Extrakt der klinischen Probe sowie Verdünnungen dieses Extrakts hergestellt. Die Extraktverdünnungen werden hierauf mit Puffer oder verdünntem Antitoxin vermischt. Nach einer Inkubationsperiode wird ein Aliquot jeder Mischung in eine Mikrotitervertiefung oder ein Reagenzglas mit einer Gewebekulturzellen-Molekularschicht übertragen. Bei Vorhandensein von *C. difficile*-Toxin weisen die Zellen eine typische Rundung auf. Das Toxinkontrollreagenz dient dazu, diese Erscheinung nachzuweisen und zu zeigen, dass es mittels *C. difficile*-Antitoxin neutralisiert wird. Weisen die Probenextraktverdünnungen eine Rundung auf und wird diese durch das *C. difficile*-Antitoxin neutralisiert, so ist dies eine Bestätigung für das Vorhandensein von *C. difficile*-Toxin.

### PACKUNGSMENGE

1. **T3000** Lyophilisiertes *C. difficile*-Toxinkontrollreagenz - 1 mL (Zytotoxizitätstiter  $>10^4$ )
2. **T1000** Lyophilisiertes *C. difficile*-Antitoxin - 3 mL (Ziege)

### NICHT IM PACKUNGSMENGE ENTHALTEN

Reagenzgläser zur Verdünnungsherstellung	Pipetten/Pipettierer
Zentrifuge	Sterile Filter zur Extrakterstellung
Gewebekulturzellen	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)
Inkubator	Mikroskop zur Zellbeobachtung

### VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Verwenden Sie Stuhlproben innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Gefrorene Proben (-20°C oder darunter) können aufgrund des Einfrier- und Auftauvorganges Aktivitätsverluste aufweisen. VERMEIDEN SIE WIEDERHOLTES EINFRIEREN UND AUFTAUEN DER PROBEN. DIES KANN ZU INAKTIVITÄT DES TOXINS FÜHREN.
2. Sämtliche Proben sind als potenziell infektiöses Material zu behandeln.
3. Das Toxinkontrollreagenz enthält biologisch aktives Toxin und ist mit Vorsicht zu behandeln. Das Antitoxin stellt keine bekannte Gefahr dar.
4. Verwenden Sie die Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums.



5. Lagern Sie die Reagenzien nach Anweisung des Herstellers. Dies verlängert die Haltbarkeit der Reagenzien.
6. Stellen Sie die Reagenzien nach dem Testverfahren zurück in den Kühlschrank.

### ENTNAHME UND HANDHABUNG DER STUHLPROBEN

**BITTE BEACHTEN:** Die üblichen Labormethoden zur Entnahme und Handhabung von Stuhlproben sind geeignet. Die Proben müssen so rasch wie möglich transportiert und bei Temperaturen zwischen 2 °C und 8 °C gelagert werden. Nach Möglichkeit sollten die Stuhlproben beim Test weniger als 24 Stunden alt sein. Lagern Sie die Proben bei -20 °C oder darunter, wenn der Test nicht innerhalb von 48 Stunden durchgeführt werden kann. **DAS EINFRIEREN UND AUFTAUEN, BESONDERS WENN ES MEHRFACH ERFOLGT, FÜHRT ZU EINEM AKTIVITÄTSVERLUST AUFGRUND DES TOXINVERFALLS.** Stellen Sie sicher, dass die Proben vor der Testdurchführung gründlich gemischt werden (Vortexen). Insbesondere müssen diese vor der Vorbereitung des Stuhlextraktes vollständig gemischt werden.

### VERFAHREN

**BITTE BEACHTEN:** Das in der Folge erläuterte Verfahren kann für den Nachweis von *C. difficile*-Toxin in Stuhlproben mit dem *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin-Kit verwendet werden (8). Alternativ kann das Kit für andere modifizierte interne Verfahren verwendet werden. Es ist in jedem Falle wichtig, dass das Toxinkontrollreagenz und das *C. difficile*-Antitoxin gemäß den Anweisungen verwendet werden. Nach Rekonstitution des Toxinkontrollreagenzes und des Antitoxinreagenzes teilen Sie die Reagenzien in kleine Mengen (50 bis 100 µL) zu gleichen Teilen auf und frieren die nicht verdünnten Aliquote ein. Um eine Dehydrierung des aliquotierten Toxins und Antitoxin zu vermeiden, wird die Verwendung luftdichter Fläschchen empfohlen. Das **verdünnte** Toxinkontrollreagenz bzw. verdünnte Antitoxinreagenz nicht einfrieren! Unverdünnte Aliquote der Reagenzien je nach Bedarf auftauen und verwenden.

### ZUBEREITUNG DER KONTROLLEN UND STUHLFILTRATE

1. **TOXINKONTROLLREAGENZ:** Fügen Sie dem lyophilisierten Toxinkontrollreagenz 1 mL steriles destilliertes Wasser hinzu. Teilen Sie das unverdünnte Reagenz zu gleichen Teilen in kleine Mengen (50 bis 100 µL) auf und lagern Sie die nicht gebrauchten Aliquote bei mind. -20°C in einem Tiefkühlschrank ohne automatische Abtaufunktion. Um die Dehydrierung der unverdünnten Aliquote zu minimieren, wird die Verwendung luftdichter Fläschchen empfohlen. Bereiten Sie zur Verwendung des Toxinkontrollreagenz 10-fache Verdünnungen ( $10^1$  bis  $10^5$ ) in steriler PBS vor.
2. **ANTITOXINREAGENZ:** Fügen Sie dem lyophilisierten Antitoxinreagenz 3 mL steriles destilliertes Wasser hinzu. Teilen Sie das unverdünnte Reagenz zu gleichen Teilen in kleine Mengen (50 bis 100 µL) auf und lagern Sie die nicht gebrauchten Aliquote bei mind. -20°C. Bereiten Sie zur Verwendung des Antitoxinreagenz eine Verdünnung im Verhältnis 1:25 mit steriler PBS vor.
3. **STUHLFILTRAT.** Verwenden Sie unverdünnte Stuhlproben für wässrige Proben oder verdünnen Sie im Verhältnis 1:1 mit steriler PBS. Zentrifugieren Sie die Probe 10 Minuten bei 10.000 x g und filtrieren Sie die Überstandsflüssigkeit durch eine 0,45 µm-Membran. Bereiten Sie 10-fache Verdünnungen ( $10^1$  bis  $10^5$ ) in steriler PBS vor.

### DURCHFÜHRUNG DES TESTS IN MIKROTITERVERTIEFUNGEN

(Mischen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung oder dem Dispensieren gründlich durch. Die Mischungen können in sterilen Mikrotitervertiefungen oder Reagenzgläsern vorbereitet werden)

1. Mischen Sie 1 Teil (0,1 mL) jeder Toxinkontrollreagenzverdünnung mit 1 Teil (0,1 mL) steriler PBS. Diese Serie dient als positive Kontrolle und zeigt die von *C. difficile*-Toxin verursachte typische Zellrundung auf.

2. Mischen Sie 1 Teil (0,1 mL) jeder Toxinkontrollverdünnung mit 1 Teil (0,1 mL) verdünntem Antitoxin. Diese Serie dient als Antitoxinkontrolle und zeigt die durch das Antitoxin verursachte Neutralisierung von *C. difficile*-Toxin auf.
3. Mischen Sie 1 Teil (0,1 mL) jeder Stuhlfiltratverdünnung mit 1 Teil (0,1 mL) steriler PBS. Diese Serie weist die zytotoxische Aktivität (d.h. Zellrundung) in der Stuhlprobe nach.
4. Mischen Sie 1 Teil (0,1 mL) jeder Stuhlfiltratverdünnung mit 1 Teil (0,1 mL) verdünntem Antitoxin. Diese Serie bestätigt das Vorhandensein von *C. difficile*-Toxin, wenn die zytotoxische Aktivität durch das Antitoxin neutralisiert wird.
5. Inkubieren Sie die Mischungen 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
6. Fügen Sie den Mikrotitervertiefungen mit den Molekularschichten 20 µL jeder Testmischung mithilfe einer Mikropipette (neue Spitze für jede Verdünnung) hinzu. Inkubieren Sie die Vertiefungen über Nacht (18 Stunden) bei  $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  unter für die im Test verwendeten Gewebekulturzellen geeigneten Bedingungen. Etliche Zelllinien benötigen  $\text{CO}_2$  und feuchte Umgebung. Andere Zelllinien verhalten sich angemessen in HEPES-gepufferten Medien und benötigen kein  $\text{CO}_2$ . Beobachten Sie den Zustand der Zellen. Eine positive Reaktion wird durch Zellrundung angezeigt.

### DURCHFÜHRUNG DES TESTS IN KULTURRÖHRCHEN

(Mischen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung oder dem Dispensieren gründlich durch. Die Mischungen in sterilen Reagenzgläsern vorbereiten)

1. Mischen Sie 1 Teil (0,2 mL) jeder Toxinkontrollreagenzverdünnung mit 1 Teil (0,2 mL) steriler PBS. Diese Serie dient als positive Kontrolle und zeigt die von *C. difficile*-Toxin verursachte typische Zellrundung auf.
2. Mischen Sie 1 Teil (0,2 mL) jeder Toxinkontrollverdünnung mit 1 Teil (0,2 mL) verdünntem Antitoxin. Diese Serie dient als Antitoxinkontrolle und zeigt die durch das Antitoxin verursachte Neutralisierung von *C. difficile*-Toxin auf.
3. Mischen Sie 1 Teil (0,2 mL) jeder Stuhlfiltratverdünnung mit 1 Teil (0,2 mL) steriler PBS. Diese Serie weist die zytotoxische Aktivität (d.h. Zellrundung) in der Stuhlprobe nach.
4. Mischen Sie 1 Teil (0,2 mL) jeder Stuhlfiltratverdünnung mit 1 Teil (0,2 mL) verdünntem Antitoxin. Diese Serie bestätigt das Vorhandensein von *C. difficile*-Toxin, wenn die zytotoxische Aktivität durch das Antitoxin neutralisiert wird.
5. Inkubieren Sie die Mischungen 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
6. Fügen Sie den Kulturröhrchen mit den Molekularschichten eine ausreichende Menge jeder Testmischung mithilfe einer sterilen Pipette für die einzelnen Kontrollen und Stuhlfiltrate hinzu, um so eine 1/10-Verdünnung zu erhalten. Geben Sie z.B. 0,2 mL Mischung in ein Röhrchen mit 1,8 mL. Verschließen Sie die beimpften Kulturröhrchen erneut. Inkubieren Sie die Vertiefungen über Nacht (18 Stunden) bei  $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  unter für die im Test verwendeten Gewebekulturzellen geeigneten Bedingungen. Etliche Zelllinien benötigen  $\text{CO}_2$  und feuchte Umgebung. Andere Zelllinien verhalten sich angemessen in HEPES-gepufferten Medien und benötigen daher kein  $\text{CO}_2$ . Beobachten Sie den Zustand der Zellen. Eine positive Reaktion wird durch Zellrundung angezeigt.

### QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jeder Testprobenserie müssen eine positive und negative Kontrolle mitgetestet werden. Dazu gehören das mit Puffer vermischte Toxinkontrollreagenz, das als positive Kontrolle dient, sowie das mit Antitoxin vermischte Toxinkontrollreagenz für den Nachweis der Neutralisierung der zytotoxischen Aktivität. Die positive Kontrolle muss die für *C. difficile*-Toxin typische Rundung aufweisen. Die Testergebnisse sind nur dann gültig, wenn die Leistungsdaten erfüllt werden. Wenden Sie sich an den technischen Kundendienst, wenn die Leistungsdaten nicht erfüllt werden, und melden Sie die Testergebnisse nicht.

Bei Erhalt muss das Kit überprüft werden, ob sich die Bestandteile in einwandfreiem Zustand befinden. Jedes Fläschchen muss auf Anzeichen von lyophilisiertem Pulver

überprüft werden. Die Testergebnisse müssen zusammen mit den Kontrollergebnissen gemäß interner Verfahrensweise aufgezeichnet und gemeldet sowie für den späteren Gebrauch nach interner Verfahrensweise archiviert werden.

### AUSLEGUNG UND AUFZEICHNUNG DER ERGEBNISSE

Die mit Puffer vermischten Toxinkontrollreagenzverdünnungen müssen bis zur letzten oder vorletzten Verdünnung Zellrundung aufweisen. Die mit Antitoxin vermischten Toxinkontrollreagenzverdünnungen müssen bis zur  $10^4$ -Verdünnung +/- eine Verdünnung neutralisiert sein. In Mischungen mit Stuhlfiltratverdünnungen und Puffer weist eine Zellrundung auf das Vorhandensein von zytotoxischer Aktivität hin. Wird diese Aktivität in den Stuhlfiltratverdünnungen mit Antitoxin neutralisiert, so bestätigt dies das Vorhandensein von *C. difficile*-Toxin.

Proben mit zytotoxischer Aktivität, die durch *C. difficile*-Antitoxin neutralisiert wird, sind als „Positiv für *C. difficile*-Toxin“ zu verzeichnen. Proben ohne zytotoxische Aktivität sind als „Negativ für *C. difficile*-Toxin“ zu verzeichnen. Proben, die eine Zellrundung verursachen, die nicht durch *C. difficile*-Antitoxin neutralisiert wird, sind als „Zytotoxische Aktivität vorhanden, jedoch nicht charakteristisch für *C. difficile*-Toxin“ zu verzeichnen.

### GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Das *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin-Kit dient zum Nachweis von *C. difficile*-Toxin in Stuhlproben. Der Nachweis von Toxin hängt von der biologischen Aktivität des Toxins ab. Die Proben müssen ordnungsgemäß gehandhabt und gemäß Anweisungen gelagert werden, um die Inaktivierung des Toxins so gering wie möglich zu halten.
2. Einige Proben liefern unter Umständen nicht eindeutige Reaktionen (z.B. partielle Rundung der Zellen, Dehnung statt Rundung). Unter diesen Bedingungen sollte die Probe nochmals getestet oder eine neue Stuhlprobe getestet werden. Zusätzliche Tests, die gemeinsam mit dem *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin-Kit durchgeführt werden können, sind das ELISA für Toxin A, Isolierung des Organismus auf selektiven Medien, sowie der Antigennachweis.
3. Einige Isolate von *Clostridium sordellii* verursachen dieselbe Art von Rundung bei Gewebekulturzellen wie toxische *Clostridium difficile*. Dies ist auf die Ähnlichkeit zwischen den *C. sordellii*-Toxinen und *C. difficile*-Toxinen zurückzuführen. *Clostridium sordellii* wurde nicht bei Patienten mit Antibiotika-assoziiierter Diarrhöe und Kolitis nachgewiesen. Das Vorhandensein von *C. sordellii* in menschlichen Stuhlproben ist unwahrscheinlich.

### LEISTUNGSDATEN

In einer intern bei TECHLAB®, Inc. durchgeführten Studie erwiesen sich 87 von 100 eingesandten Proben aus einer vorhergehenden *C. difficile*-Studie als positiv für zytotoxische Aktivität. Alle 87 Proben wurden unter Verwendung von *C. sordellii*-Antitoxin aus dem US-amerikanischen Bureau of Biologics und *C. difficile*-Antitoxin von TECHLAB® als positiv für *C. difficile*-Toxin bestätigt. Das *C. difficile*-Antitoxin von TECHLAB® wies daher im Vergleich zu *C. sordellii*-Antitoxin eine Sensitivität und Spezifität von 100% auf. Die positiven und negativen vorhersehbaren Werte sowie die Korrelation mit *C. sordellii*-Antitoxin betragen ebenfalls 100%.

Im Rahmen einer weiteren Studie an einem VA Medical Center im mittleren Westen erwiesen sich von den 85 zum Testen auf *C. difficile* eingesandten Proben unter Verwendung von *C. sordellii*-Antitoxin 20 als positiv für *C. difficile*-Toxin, während 19 unter Verwendung des *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin-Kits als positiv bestätigt wurden. Die Probe, die sich bei *C. sordellii*-Antitoxin als positiv und im *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin-Kit als negativ erwies, war nur schwach positiv. Die Sensitivität und Spezifität bei dieser Studie betragen 95% bzw. 100%. Die positiven und negativen vorhersagbaren Werte lagen bei 100% bzw. 98,5%, die Korrelation betrug 98,8%.

Insgesamt lagen die Sensitivität und Spezifität des *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin-Kits im Vergleich zu *C. sordellii*-Antitoxin bei 99,2% bzw. 100%. Die positiven und negativen vorhersagbaren Werte lagen bei 100% bzw. 98,8%, die Gesamtkorrelation betrug 99,5%.

### ERWARTUNGSWERTE

Im Rahmen einer Studie mit interner Probenanalyse bei TECHLAB®, Inc. betrug die Prävalenz eines positiven Gewebekulturtests bei in das klinische Labor eingesandten Proben etwa 20%. Bei der Studie im Midwestern VA Medical Center im mittleren Westen betrug die Prävalenz 23,5%. Die Prävalenz ist von Ort zu Ort unterschiedlich. Krankenhäuser können auch niedrigere oder höhere Raten als jene an diesem Standort festgestellt aufweisen. *Clostridium difficile* –assoziierte Erkrankungen treten vor allem als nosokomiale Infektionen bei älteren Patienten auf. Krankenhäuser mit einem höheren Anteil an älteren Patienten können daher höhere Raten aufweisen. Die Testergebnisse müssen stets gemeinsam mit klinischen Symptomen interpretiert werden, denn einige gesunde Erwachsene sowie viele gesunde Kleinkinder (bis zu 50 %) weisen ein positives Testergebnis für *C. difficile*-Toxin auf. Zudem wurde bei Mukoviszidose-Patienten eine *C. difficile*-Trägerrate von 22-32 % festgestellt (10-12).

### KREUZREAKTIVITÄT

Toxische Filtrate aus *C. chauveoi*, *C. fallax*, *C. perfringens*, *C. septicum* und *C. spiroforme* wurden nicht durch das *C. difficile*-Antitoxin von TECHLAB® neutralisiert. Auch *C. perfringens* Alpha-Toxin, *C. histolyticum* Kollagenase und Clostripain, Cholera toxin, Diphtherietoxin, Shigatoxin und Staphylokokkenenterotoxin wurden nicht neutralisiert. Der einzige Organismus mit bekannter Kreuzreaktivität im *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin-Kit ist *C. sordellii*. Bestimmte toxigene Isolate von *C. sordellii* bilden Toxine, die den *C. difficile*-Toxinen sehr ähnlich sind. Das hämorrhagische Toxin (HT) aus *C. sordellii* weist große Ähnlichkeit mit Toxin A auf, während das tödliche Toxin (LT) große Ähnlichkeit mit Toxin B aufweist. *C. difficile*-Toxin-Antikörper neutralisieren HT und LT aus *C. sordellii*. HT- und LT-Antikörper neutralisieren Toxin A und B. Es wird darauf hingewiesen, dass *C. sordellii* nicht mit Antibiotika-assoziiertes Diarrhöe und Kolitis in Verbindung gebracht wurde.

### REPRODUZIERBARKEIT UND PRÄZISION

Identische Probensets mit jeweils fünf Stuhlproben wurden von TECHLAB®, Inc. in drei verschiedene Labors für eine Analyse mit dem *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin-Kit eingesandt. Ein Labor befand sich an der Ostküste, die anderen beiden im mittleren Westen der USA. Die Testergebnisse aus den einzelnen Labors stimmten mit den intern bei TECHLAB®, Inc. erzielten Ergebnissen überein. Im Rahmen einer internen Studie wurden 10 positive Stuhlproben nach 0, 24, 48, und 72 Stunden mit dem *Clostridium difficile* Toxin/Antitoxin-Kit getestet. Diese Proben erwiesen sich bei jedem Zeitintervall als konsistent positiv für *C. difficile*-Toxin, wie mittels Neutralisierung der zytotoxischen Aktivität festgestellt wurde. Die Proben wurden während der Testperiode bei 4°C gelagert. Bei einigen Stuhlproben ist die zytotoxische Aktivität nicht stabil und nimmt nach der Inkubation bei 4°C ab. Bei weiteren internen Studien wurden drei verschiedene Chargen des positiven Kontrollreagenz in doppelter Ausführung getestet, die konsistente Zytotoxizitätstiter von 10<sup>4</sup> oder höher ergaben. Weitere Evaluierungen zeigten, dass fünf verschiedene Chargen des *C. difficile*-Antitoxins die Verdünnungen des positiven Kontrollreagenz konsistent neutralisierten.

## Kit de détection des toxines/antitoxines du *C. difficile* - FRANCAIS

### UTILISATION PRÉVUE

Le Kit de détection des toxines/antitoxines du *Clostridium difficile* est conçu pour être utilisé en association avec l'essai de cytotoxicité par culture tissulaire permettant de confirmer la présence de la toxine *Clostridium difficile* dans les échantillons de selles des patients. Ce kit comprend un réactif de contrôle de la toxine et une antitoxine *C. difficile* spécifique à utiliser dans le cadre des essais par culture tissulaire. Le test permet de diagnostiquer la maladie du *C. difficile* ; les résultats obtenus doivent néanmoins être évalués en association avec le passé médical du patient.

POUR UNE UTILISATION DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

### EXPLICATION

Le *Clostridium difficile* est un pathogène nosocomial considéré comme responsable de la plupart des cas de colites pseudomembraneuses et de nombreux cas de diarrhées associées aux antibiotiques (1). Son rôle entéropathogène a été mis en évidence à la fin des années 1970 suite aux résultats obtenus par un certain nombre de laboratoires démontrant que (i) le *C. difficile* pouvait être isolé chez des patients atteints de colite pseudomembraneuse, (ii) que les isolats produisaient le même effet cytotoxique que celui observé sur les échantillons de selles des patients (c.-à-d., effet d'arrondissement), et (iii) que les isolats entraînaient des maladies gastro-intestinales semblables à celles observées chez les hamsters traités aux antibiotiques. Les troubles occasionnés par le *C. difficile* sont dus aux toxines qu'il produit. Il existe deux toxines associées à cette maladie : la A et la B. La toxine A est une puissante entérotoxine, mortelle pour les animaux de laboratoires et cytotoxique pour les cellules obtenues par culture tissulaire. Quant à la toxine B, elle est également mortelle et cytotoxique pour les cellules. Beaucoup plus cytotoxique que la toxine A pour la plupart des cellules obtenues par culture tissulaire, la toxine B est souvent désignée sous le nom de cytotoxine. C'est la puissante activité cytotoxique de la toxine B ou son effet arrondissant qui ont amené les chercheurs à l'utiliser comme marqueur de la toxine du *C. difficile* dans les échantillons de selles. Cependant, étant donnée l'activité entérotoxique de la toxine A dans l'intestin, on pense que la toxine A est responsable de la plupart des symptômes liés à la maladie (2,3), ce qui n'exclut pas le rôle de la toxine B vu que certains indices suggèrent l'existence d'un effet synergique entre ces toxines.

La découverte avérée de toxine *C. difficile* dans les échantillons de selles des patients présentant des colites pseudomembraneuses (CPM) est le résultat d'essais par culture tissulaire. Durant la seconde moitié des années 70, les chercheurs cliniques ont observé l'existence d'une activité cytotoxique ou d'arrondissement chez les patients atteints de CPM. Ils ont ensuite découvert que l'effet cytotoxique était neutralisé par l'antitoxine de la gangrène gazeuse. De plus amples recherches ont permis de découvrir que l'antitoxine *C. sordellii* neutralisait cette activité, ce qui a amené les scientifiques à envisager les effets étiologiques du *C. sordellii*. Cependant, les études approfondies menées par la suite ont permis d'identifier le *C. difficile* comme cause de la maladie. L'activité neutralisante de l'antitoxine du *C. sordellii* a finalement été démontrée par la production de toxines (toxines HT et LT) par certaines souches toxigènes de cet organisme, très semblables aux toxines A et B du *C. difficile*. Ainsi, l'antitoxine *C. sordellii* contient-elle des anticorps présentant une réaction croisée qui neutralisent les toxines du *C. difficile*.

Les toxines du *C. difficile* sont les plus grosses toxines bactériennes connues. Le poids moléculaire des toxines A et B est égal à 308 000 et 279 000, respectivement. Les deux toxines présentent une série d'unités répétitives au niveau du COOH (*acide carboxylique*) terminal de la molécule. Les unités répétitives de la molécule de toxine A correspondent à la partie d'attachement identifiant les récepteurs d'hydrate de carbone. La séquence des acides aminés (4,5) de ces toxines est globalement similaire à environ 45%. Ces observations, ajoutées au fait que

les toxines produisent les mêmes effets sur des cellules obtenues par culture tissulaire, suggèrent que les toxines ont le même mécanisme d'action. Les gènes de ces toxines sont localisés à une distance d'environ 1 kb avec un petit ORF (cadre de lecture ouverte) situé entre eux. La plupart des souches toxigènes du *C. difficile* produisent soit les deux toxines, soit aucune d'entre elles, bien que les souches A négative/B positives des toxines aient été récemment identifiées (6-8).

Il existe actuellement quatre méthodes permettant de détecter le *C. difficile* et ses toxines dans les échantillons de selles. Ces méthodes sont les suivantes : (i) isolement de l'organisme, (ii) détection de l'antigène, (iii) essais par culture tissulaire et (iv) test ELISA destiné à la détection de la toxine. L'isolement de l'organisme et la détection de l'antigène permettent notamment de déceler la présence de l'organisme dans les échantillons de selles. Cependant, ni l'un ni l'autre de ces essais ne démontre la présence de la toxine. À cet effet, il est nécessaire de recourir à des essais par culture tissulaire ou à l'utilisation d'un test ELISA de détection des toxines. Le procédé de culture tissulaire s'est avéré très efficace en raison de la forte activité de la toxine B du *C. difficile* lors des essais. Il suffit d'un seul picogramme de toxine pour obtenir une réaction positive. La neutralisation de l'activité cytotoxique par l'antitoxine du *C. difficile* confirme la présence de la toxine du *C. difficile*. Le test doit être utilisé pour permettre de diagnostiquer la maladie du *C. difficile* et les résultats doivent être évalués en association avec le passé médical du patient. En effet, certains adultes sont des porteurs asymptomatiques et leurs selles peuvent présenter des niveaux détectables de toxine sans que les sujets ne présentent de symptômes cliniques. Par ailleurs, la toxine du *C. difficile* peut être présente dans les selles de près de 50% des enfants sains sans qu'ils ne présentent le moindre signe de maladie. Il est donc essentiel de considérer les résultats des tests à la lumière des antécédents médicaux du patient.

## PRINCIPE DU TEST

Le Kit de détection des toxines/antitoxines du *Clostridium difficile* contient deux réactifs. Un réactif de contrôle utilisé comme produit de contrôle positif, d'une part. Et un réactif spécifique à l'antitoxine du *C. difficile* utilisé pour confirmer la présence de la toxine du *C. difficile* par la neutralisation de l'activité cytotoxique, d'autre part. Dans le cadre de l'essai, le réactif de contrôle est dilué et mélangé soit avec le tampon, soit avec l'antitoxine diluée. Par ailleurs, il est nécessaire de préparer un spécimen clinique en vue de ses différentes dilutions. Le spécimen dilué est ensuite mélangé avec le tampon ou l'antitoxine diluée. Après une période d'incubation, une partie aliquote de chaque mélange est introduite dans un puits ou un tube microtitre contenant une couche monocellulaire de culture tissulaire. En présence de la toxine du *C. difficile*, les cellules subissent un effet d'arrondissement caractéristique. Le réactif de contrôle de la toxine permet de démontrer cet effet et de prouver que celui-ci est neutralisé par l'antitoxine du *C. difficile*. La présence de toxine du *C. difficile* est confirmée dès lors que les dilutions du spécimen présentent un effet d'arrondissement et que cet effet est neutralisé par l'antitoxine du *C. difficile*.

## MATÉRIEL FOURNI

1. **T3000** Réactif de contrôle lyophilisé de la toxine du *C. difficile* - 1 ml (titre cytotoxique  $>10^4$ )
2. **T1000** Antitoxine lyophilisée du *C. difficile* - 3 ml (d'origine caprine)

## MATÉRIEL NON FOURNI

Tubes à essai pour la préparation des dilutions	Pipettes/Pipetteur
Centrifugeuse	Filtres stériles de préparation des spécimens
Cellules obtenues par culture tissulaire	Solution saline tamponnée au phosphate (PBS)
Incubateur	Microscope d'observation des cellules



## PRÉCAUTIONS À PRENDRE

1. Utiliser les échantillons de selles dans les 24 heures suivant le prélèvement, et ce afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles. Les échantillons congelés (-20°C au moins) peuvent perdre de leur activité suite à la congélation et à la décongélation. **ÉVITER LES CYCLES RÉPÉTÉS DE CONGÉLATION ET DE DÉCONGÉLATION DES ÉCHANTILLONS. CECI POURRAIT NEUTRALISER LA TOXINE.**
2. Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux ; ils doivent donc être manipulés de façon appropriée.
3. Le réactif de contrôle contient une toxine biologiquement active et doit être utilisé avec prudence. L'antitoxine ne présente aucun risque connu.
4. Ne pas utiliser les réactifs si leur date d'expiration est dépassée.
5. Entreposer les réactifs conformément aux recommandations du fabricant de façon à en prolonger la durée de conservation.
6. Remettre les réactifs au réfrigérateur dès que la procédure de test est terminée.

## PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

**REMARQUE :** Les procédures standard utilisées en interne pour le prélèvement et la manipulation des échantillons sont considérées appropriées. Les échantillons doivent être transportés le plus rapidement possible et stockés à une température comprise entre 2 et 8°C. Utiliser de préférence des échantillons de selles de moins de 24 heures. Conserver les échantillons à -20°C au moins si le test ne peut être réalisé dans un délai de 48 heures après le prélèvement. **LA CONGÉLATION ET LA DÉCONGÉLATION DE L'ÉCHANTILLON, EN PARTICULIER EN CAS DE CONGÉLATIONS/DÉCONGÉLATIONS MULTIPLES, PEUVENT ENTRAÎNER UNE PERTE D'ACTIVITÉ DE LA TOXINE DUE À SA DÉGRADATION.** Veiller à ce que les échantillons soient bien mélangés (mixés) avant de réaliser l'essai, ce qui signifie que l'échantillon doit être complètement mélangé avant la préparation de l'extrait de selles.

## PROCÉDURE

**REMARQUE :** La procédure décrite ci-dessous peut être appliquée pour détecter la toxine du *C. difficile* dans les échantillons de selles à l'aide du Kit de détection des toxines/antitoxines du *Clostridium difficile* (8). Ce kit peut également être utilisé suivant d'autres procédures internes modifiées. Il faut toutefois souligner que le réactif de contrôle de la toxine et l'antitoxine du *C. difficile* doivent être utilisés conformément aux consignes indiquées. Après avoir reconstitué le réactif de contrôle de la toxine et le réactif antitoxine, aliquoter les réactifs en petits volumes (50 à 100 µl) et congeler les aliquotes non diluées. Il convient d'utiliser des flacons hermétiques afin d'éviter la déshydratation de la toxine et de l'antitoxine aliquotées. Ne pas congeler le réactif de contrôle de toxine dilué ou le réactif antitoxine **dilué**. Décongeler au besoin et utiliser des aliquotes non diluées de chaque réactif.

## PRÉPARATION DES CONTRÔLES ET DES FILTRATS DE SELLES

1. **RÉACTIF DE CONTRÔLE DE LA TOXINE.** Ajouter 1 ml d'eau distillée stérile au réactif de contrôle lyophilisé de la toxine. Aliquoter de petits volumes (50 à 100 µl) de réactif non dilué et stocker les aliquotes inutilisées à -20°C ou température inférieure dans un congélateur non dégivrant. Utiliser des flacons hermétiques pour réduire au maximum la déshydratation des aliquotes non diluées. Pour utiliser le réactif de contrôle de la toxine, le diluer à 1:10 (10<sup>1</sup> à 10<sup>5</sup>) dans une solution PBS stérile.
2. **RÉACTIF ANTITOXINE.** Ajouter 3 ml d'eau distillée stérile au réactif antitoxine lyophilisé. Aliquoter de petits volumes (50 à 100 µl) de réactif non dilué et stocker les aliquotes inutilisées à -20°C ou température inférieure. Pour utiliser le réactif antitoxine, le diluer à 1:25 dans une solution PBS stérile.
3. **FILTRAT DE SELLES.** Utiliser un échantillon de selles non dilué si le prélèvement est aqueux ou diluer à 1:1 dans une solution PBS stérile. Centrifuger l'échantillon à 10.000 x g pendant 10 minutes et filtrer le liquide surnageant au moyen d'une membrane de 0,45 µm. Diluer à 1:10 (10<sup>1</sup> à 10<sup>5</sup>) dans une solution PBS stérile.



## RÉALISATION DE L'ANALYSE DANS DES PUIITS MICROTITRE

(Mélanger soigneusement tous les réactifs avant utilisation ou distribution. Les mélanges peuvent être préparés en puits microtitre ou en tubes à essais stériles).

1. Mélanger 1 part (0,1 ml) de chaque dilution du réactif de contrôle de la toxine dans 1 part (0,1 ml) de PBS stérile. Cette série constitue le contrôle positif et démontre l'arrondissement caractéristique des cellules provoqué par la toxine du *C. difficile*.
2. Mélanger 1 part (0,1 ml) de chaque dilution du réactif de contrôle de la toxine dans 1 part (0,1 ml) d'antitoxine diluée. Cette série constitue le contrôle antitoxine et démontre la neutralisation de la toxine du *C. difficile* par l'antitoxine.
3. Mélanger 1 part (0,1 ml) de chaque dilution de filtrat de selles dans 1 part (0,1 ml) de PBS stérile. Cette série permet de détecter l'existence d'une activité cytotoxique (c.-à-d., l'arrondissement des cellules) dans l'échantillon de selles.
4. Mélanger 1 part (0,1 ml) de chaque dilution de filtrat de selles dans 1 part (0,1 ml) d'antitoxine diluée. Cette série permet de confirmer la présence de la toxine du *C. difficile* si l'activité cytotoxique est neutralisée par l'antitoxine.
5. Laisser incuber les mélanges à température ambiante pendant 30 minutes.
6. À l'aide d'une micropipette et de nouveaux embouts pour chaque dilution, ajouter 20 µl de chaque mélange dans les puits microtitre contenant des monocouches de cellules. Laisser incuber les micropuits toute une nuit (18 heures) à  $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  dans des conditions appropriées aux cellules obtenues par culture tissulaire et utilisées dans le cadre de l'essai. La plupart des cellules de ce type requièrent du  $\text{CO}_2$  et une atmosphère humide. Dans d'autres cas, les cellules donnent de bons résultats dans une solution tamponnée à l'HEPES sans apport de  $\text{CO}_2$ . Observer l'état des cellules. L'arrondissement des cellules indique une réaction positive.

## RÉALISATION DE L'ANALYSE DANS DES TUBES À ESSAIS

(Mélanger soigneusement tous les réactifs avant utilisation ou distribution. Les mélanges doivent être préparés dans des tubes à essais stériles).

1. Mélanger 1 part (0,2 ml) de chaque dilution du réactif de contrôle de la toxine dans 1 part (0,2 ml) de PBS stérile. Cette série constitue le contrôle positif et démontre l'arrondissement caractéristique des cellules provoqué par la toxine du *C. difficile*.
2. Mélanger 1 part (0,2 ml) de chaque dilution du réactif de contrôle de la toxine dans 1 part (0,2 ml) d'antitoxine diluée. Cette série constitue le contrôle antitoxine et démontre la neutralisation de la toxine du *C. difficile* par l'antitoxine.
3. Mélanger 1 part (0,2 ml) de chaque dilution de filtrat de selles dans 1 part (0,2 ml) de PBS stérile. Cette série permet de détecter l'existence d'une activité cytotoxique (c.-à-d., l'arrondissement des cellules) dans l'échantillon de selles.
4. Mélanger 1 part (0,2 ml) de chaque dilution de filtrat de selles dans 1 part (0,2 ml) d'antitoxine diluée. Cette série permet de confirmer la présence de la toxine du *C. difficile* si l'activité cytotoxique est neutralisée par l'antitoxine.
5. Laisser incuber les mélanges à température ambiante pendant 30 minutes.
6. Utiliser une pipette stérile pour chaque filtrat de contrôle et de selles ; ajouter un volume suffisant de chaque mélange pour l'incubation des tubes contenant des monocouches de cellules afin d'obtenir une dilution à 1:10. Introduire, par exemple, 0,2 ml de mélange dans un tube contenant 1,8 ml. Remettre les capsules sur les tubes à essai inoculés. Laisser incuber les micropuits toute une nuit (18 heures) à  $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  dans des conditions appropriées aux cellules obtenues par culture tissulaire et utilisées dans le cadre de l'essai. La plupart des cellules de ce type requièrent du  $\text{CO}_2$  et une atmosphère humide. Dans d'autres cas, les cellules donnent de bons résultats dans une solution tamponnée à l'HEPES sans apport de  $\text{CO}_2$ . Observer l'état des cellules. L'arrondissement des cellules indique une réaction positive.

## CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Les contrôles positifs et négatifs doivent être effectués sur chaque série d'analyses d'échantillons. Ceci inclut le réactif de contrôle de la toxine mélangé au

tampon comme contrôle positif, d'une part, et le réactif de contrôle de la toxine mélangé à l'antitoxine permettant de démontrer la neutralisation de l'activité cytotoxique, d'autre part. Le contrôle positif doit en principe révéler l'effet d'arrondissement caractéristique de la toxine du *C. difficile*. Les résultats des essais ne sont admissibles que si ces caractéristiques sont réunies. Dans le cas contraire, veuillez contacter nos services techniques et ignorer les résultats obtenus.

Le kit doit être inspecté dès réception de façon à vérifier que tous ses composants sont en parfait état de fonctionnement. Les flacons doivent être examinés individuellement de façon à vérifier qu'ils contiennent bien une poudre lyophilisée. Les résultats des tests et des contrôles doivent être consignés et archivés conformément aux procédures internes de l'établissement pour toute référence ultérieure.

## INTERPRÉTATION ET EXPLOITATION DES RÉSULTATS

Les dilutions du réactif de contrôle de la toxine mélangées au tampon devraient mettre en évidence l'arrondissement des cellules de la dernière ou de l'avant-dernière dilution. Les dilutions du réactif de contrôle de la toxine mélangé à l'antitoxine devraient être neutralisées par la dilution  $10^4$  +/- une dilution. Dans les mélanges contenant des dilutions de filtrat de selles et de tampon, l'arrondissement des cellules indique l'existence d'une activité cytotoxique. Si cette activité est neutralisée dans les dilutions de filtrat de selles et d'antitoxine, la présence de la toxine du *C. difficile* est confirmée.

Les échantillons présentant une activité cytotoxique neutralisée par l'antitoxine du *C. difficile* doivent être considérés « *C. difficile*-positifs ». Les échantillons ne présentant aucune activité cytotoxique doivent être considérés « *C. difficile*-négatifs ». Les échantillons présentant un arrondissement de cellules non neutralisé par l'antitoxine du *C. difficile* doivent être signalés comme « présentant une activité cytotoxique non caractéristique de la toxine du *C. difficile* ».

## LIMITES DE LA PROCÉDURE

1. Le Kit de détection des toxines/antitoxines du *Clostridium difficile* est utilisé pour déceler la toxine du *C. difficile* dans les échantillons de selles. La détection de la toxine dépend de l'activité biologique de celle-ci. Les échantillons doivent être correctement manipulés et stockés afin de réduire au maximum tout risque d'inactivation de la toxine.
2. Certains échantillons peuvent réagir de façon peu concluante (par exemple, arrondissement partiel des cellules, allongement des cellules au lieu d'arrondissement). Le cas échéant, un nouveau test doit être effectué sur le même échantillon ou sur un échantillon frais. Des essais complémentaires peuvent être utilisés en association avec le Kit de détection des toxines/antitoxines du *Clostridium difficile*: les tests ELISA spécifiques à la toxine, l'isolement de l'organisme dans un milieu sélectif ou la détection de l'antigène.
3. Certains isolats de *Clostridium sordellii* produisent le même type d'arrondissement que le *Clostridium difficile* toxinogène sur des cellules obtenues par culture tissulaire ; ceci est dû aux similitudes existant entre les toxines du *C. sordellii* et celles du *C. difficile*.

Le *Clostridium sordellii* n'a pas été détecté chez les patients présentant des diarrhées et des colites associées aux antibiotiques. Il est peu probable que le *C. sordellii* soit présent dans des échantillons de selles humaines.

## EFFICACITÉ DU TEST

Lors d'une étude réalisée en interne par TECHLAB®, Inc., sur 100 échantillons provenant d'une étude antérieure sur le *C. difficile*, 87 présentaient une activité cytotoxique (*C. difficile*-positifs). L'activité cytotoxique de ces 87 échantillons positifs a été confirmée au moyen de l'antitoxine du *C. sordellii* fournie par l'U.S. Bureau of Biologics et l'antitoxine *C. difficile* de TECHLAB®. Par conséquent, la sensibilité et la spécificité de l'antitoxine du *C. difficile* de TECHLAB® sont égales à 100% par rapport à

l'antitoxine du *C. sordellii*. Avec l'antitoxine du *C. sordellii*, les valeurs prédictives positives/négatives et la corrélation étaient également égales à 100%.

Lors d'une autre étude menée dans le centre-ouest par un centre hospitalier pour anciens combattants, sur 85 échantillons soumis à un test *C. difficile*, la présence de toxine *C. difficile* a été confirmée sur 20 échantillons au moyen de l'antitoxine du *C. sordellii* contre 19 échantillons confirmés par le Kit de détection des toxines/antitoxines de *Clostridium difficile*. L'échantillon signalé comme positif par l'antitoxine de *C. sordellii* et négatif par le Kit de détection des toxines/antitoxines de *Clostridium difficile* n'était que faiblement positif. Cette étude a mis en avant une sensibilité et une spécificité de 95% et 100%, respectivement. Les valeurs prédictives positives et négatives étaient de 100% et 98,5%, respectivement, et la corrélation de 98,8%.

De façon générale, la sensibilité et la spécificité du Kit de détection des toxines/antitoxines de *Clostridium difficile* atteignent 99,2% et 100%, respectivement, par rapport à l'antitoxine du *C. sordellii*. Les valeurs prédictives positives et négatives étaient de 100% et 98,8%, respectivement, et la corrélation globale de 99,5%.

## VALEURS ATTENDUES

Lors d'une étude interne menée par TECHLAB®, Inc., l'analyse des échantillons a mis en avant une prévalence positive d'environ 20% des essais par culture tissulaire sur les échantillons effectivement soumis au laboratoire clinique. En ce qui concerne l'étude réalisée par le centre hospitalier du centre-ouest, la prévalence était de 23,5%. La prévalence pouvant varier d'un site à un autre, les hôpitaux obtiendront des taux plus ou moins élevés par rapport à ceux observés sur ce site particulier. Le *Clostridium difficile* est une maladie nosocomiale principalement détectée chez les personnes âgées. Les hôpitaux accueillant une population plus importante de patients âgés peuvent donc présenter un taux plus élevés de cas. Il est important de considérer les résultats des tests en association avec les symptômes cliniques dans la mesure où certains adultes sains et un grand nombre d'enfants sains (jusqu'à 50 %) présentent des résultats positifs à la toxine du *C. difficile*. Par ailleurs, on a pu observer des taux compris entre 22 et 32 % de *C. difficile* chez des patients atteints de mucoviscidose (10-12).

## RÉACTIVITÉ CROISÉE

Les filtrats toxiques de *C. chauveoi*, *C. fallax*, *C. perfringens*, *C. septicum* et *C. spiroforme* n'ont pas été neutralisés par l'antitoxine de *C. difficile* TECHLAB®. Par ailleurs, l'alphatoxine de *C. perfringens*, de collagénase et de clostripaine du *C. histolyticum*, la toxine du choléra, de la diphtérie, de la vérotoxine et l'entérotoxine staphylococcique n'ont pas été neutralisées par l'antitoxine. Le seul organisme connu produisant une réaction croisée avec le Kit de détection des toxines/antitoxines de *Clostridium difficile* est le *C. sordellii*. Certains isolats toxigènes de *C. sordellii* produisent des toxines très semblables aux toxines du *C. difficile*. La toxine hémorragique (toxine HT) du *C. sordellii* est très similaire à la toxine A alors que la toxine létale (toxine LT) est très similaire à la toxine B. Les anticorps contre les toxines de *C. difficile* neutralisent les deux toxines HT et LT de *C. sordellii* tandis que les anticorps contre les toxines HT et LT neutralisent les toxines A et B. Il convient de souligner que le *C. sordellii* n'est pas impliqué dans les diarrhées et les colites associées aux antibiotiques.

## REPRODUCTIBILITÉ ET PRÉCISION

Des séries identiques de cinq échantillons de selles ont été envoyés par TECHLAB®, Inc. à trois laboratoires différents (un sur la côte ouest et les deux autres dans le centre-ouest) en vue de leur analyse avec le Kit de détection des toxines/antitoxines de *Clostridium difficile*. Les résultats obtenus par chaque laboratoire ont été confrontés à ceux obtenus lors des essais réalisés en interne par TECHLAB®, Inc. Lors d'une étude interne menée par TECHLAB®, Inc., dix échantillons de selles positifs ont été testés à 0, 24, 48, et 72 heures au moyen du Kit de détection des toxines/antitoxines du

*Clostridium difficile*. Ces échantillons se sont avérés systématiquement *C. difficile*-positifs pour chacune des durées indiquées, comme démontré par la neutralisation de l'activité cytotoxique. Il convient de souligner que les échantillons ont été stockés à 4°C pendant la durée des essais et que l'activité cytotoxique de certains échantillons de selles n'est pas stable et diminue lors d'une incubation à 4°C. Lors d'études internes complémentaires, trois lots différents de réactif de contrôle positif ont été soumis à deux essais et ont systématiquement produit des titres cytotoxiques de 10<sup>4</sup> ou plus. Des évaluations supplémentaires ont démontré que cinq lots différents d'antitoxine *C. difficile* neutralisaient systématiquement les dilutions de réactif de contrôle positif.

FOR INFORMATIONAL USE  
ONLY

**BIBLIOGRAPHY**

1. Lyerly, D. M., H. C. Krivan, and T. D. Wilkins. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. 1:1-18.
2. Lyerly, D. M., K. E. Saum, D. K. MacDonald, and T. D. Wilkins. 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. Infect. Immun. 47:349-352.
3. Borriello, S. P., F. E. Barclay, A. R. Welch, J. M. Ketley, T. J. Mitchell, J. Stephen, and G. E. Griffin. 1985. Host and microbial determinants of the spectrum of *Clostridium difficile* mediated gastrointestinal disorders. Microecol. Ther. 15:231-236.
4. Dove, C. H., S.-Z. Wang, S. B. Price, C. J. Phelps, D. M. Lyerly, T. D. Wilkins, and J. L. Johnson. 1990. Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. Infect. Immun. 58:480-488.
5. Barroso, L. A., S.-Z. Wang, C. J. Phelps, J. L. Johnson, and T. D. Wilkins. 1990. Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin B gene. Nucl. Acids Res. 18:4004.
6. Lyerly, D. M., N. M. Sullivan, and T. D. Wilkins. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Clostridium difficile* toxin A. J. Clin. Microbiol. 17:72-78.
7. Laughon, B. E., R. P. Viscidi, S. L. Gdovin, R. H. Yolken, and J. G. Bartlett, 1984. Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. J. Infect. Dis. 149:781-788.
8. Lyerly, C.M., L.A. Barroso, and T.C. Wilkins. 1992. Characterization of a toxin A-/toxin B + isolate of *Clostridium difficile*. Infect. Immun. 60:4633-4639.
9. Ehrich, M., R. L. Van Tassell, J. M. Libby, and T. D. Wilkins. 1980. Production of *Clostridium difficile* antitoxin. Infect. Immun. 28:1041-1043.
10. Peach, S. L., S. P. Borriello, H. Gaya, F. E. Barclay, and A. R. Welch. 1986. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* in patients with cystic fibrosis. J. Clin. Pathol. 39:1013-1018.
11. Welkon, C. J., S. S. Long, C. M. Thompson, Jr., and P. H. Gilligan. 1985. *Clostridium difficile* in patients with cystic fibrosis. Amer. J. Dis. Child. 139:805-808.
12. Wu, T. C., V. P. McCarthy, and V. J. Gill. 1983. Isolation rate and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 148:176.

FOR INFORMATIONAL USE  
ONLY