

# C. DIFFICILE TOX A/B II™

An ELISA for the detection of *Clostridium difficile* Toxins A and B.  
Catalog No. T5015 (96 Tests)

ESPAÑOL p. 9

Una prueba de ELISA para la detección de las toxinas A y B de  
*Clostridium difficile*.

Prod. No. T5015 (96 Pruebas)

DEUTSCH p. 17

Ein ELISA zum Nachweis von *Clostridium difficile*  
Toxin A und B.

Katalognummer T5015 (96 Tests)

FRANCAISE p. 25

Un ELISA pour la détection des Toxines A et B de *Clostridium difficile*.  
Numéro de Catalogue T5015 (96 Analyses)

**Developed and Manufactured by**



**TECHLAB®**

Blacksburg, VA 24060

U.S. only, 1-800-TECHLAB

TEL.: (540) 953-1664 FAX: (540) 953-1665



International Symbol Key:



Catalog Number



*In Vitro* Diagnostic Medical Device



Lot Information



Contains sufficient reagents  
for <n> tests



Temperature Limitation



Use By/Expiration Date



CE Symbol



Caution, consult  
accompanying documents

## C. DIFFICILE TOX A/B II™

### INTENDED USE

The *C. DIFFICILE TOX A/B II™* test is an enzyme immunoassay for the detection of toxins A and B produced by toxigenic strains of *Clostridium difficile*. It can be used to detect toxins A and B in fecal specimens from persons suspected of having *C. difficile* disease. 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

After treatment with antibiotics, many patients develop gastrointestinal problems ranging from mild diarrhea to severe pseudomembranous colitis. Many cases of the milder forms of gastrointestinal illness and most cases of pseudomembranous colitis are caused by *Clostridium difficile* (1). This organism is an opportunistic anaerobic bacterium that grows in the intestine once the normal flora has been altered by the antibiotic. The disease results from the toxins that the organism produces. The clinical symptoms associated with the disease are believed to be primarily due to toxin A, which is a tissue-damaging enterotoxin (2,3). *Clostridium difficile* also produces a second toxin, designated toxin B. Toxin B, which has been referred to as the cytotoxin of the organism, is the toxin detected by the tissue culture assay currently used by many laboratories. Most strains either produce both toxins or neither toxin, although recently, toxin A negative/toxin B positive strains have been identified (4,5). These toxin A negative/toxin B positive strains test positive in the *C. DIFFICILE TOX A/B II™* test (6,7).

*Clostridium difficile* strains that produce high levels of toxin A also produce high levels of toxin B. Likewise, strains that produce low levels of toxin A produce low levels of toxin B, indicating that the toxin production may be regulated similarly. Tests that detect either or both toxins are being used as diagnostic aids. The genes for the toxins have been cloned and sequenced, and some properties of the toxins are now well-defined (8,9). Both toxins are large ( $M_r$  of toxin A, 308,000;  $M_r$  of toxin B, 279,000). Toxin A has a complex series of repeating units at the COOH-terminus of the molecule and these repeating units most likely serve as the binding portion that recognizes galactose-containing receptors (10). There is some evidence suggesting that toxins A and B act synergistically and that the initial tissue damage caused by toxin A allows toxin B to exert its toxicity. Therefore, although toxin A is believed to cause most of the clinical signs, toxin B also may play an important role in the disease.

### PRINCIPLE OF THE TEST

The *C. DIFFICILE TOX A/B II™* test uses antibodies to *Clostridium difficile* toxins A and B. The microassay wells supplied with the kit contain immobilized affinity-purified polyclonal goat antibody against toxins A and B. The detecting antibody consists of a mixture of toxin A monoclonal mouse antibody conjugated to horseradish peroxidase and toxin B polyclonal goat antibody conjugated to horseradish peroxidase. In the assay, an aliquot of a fecal specimen is emulsified in the *Diluent* and the diluted specimen is then transferred to the microassay well containing the detecting antibody. If toxins A and B are present in the specimen, they will bind to the detecting antibody and to the immobilized polyclonal antibody during the incubation phase. Any unbound material is removed during the washing steps. Following the addition of substrate, a color is detected due to the enzyme-antibody-antigen complexes that form in the presence of toxin.

### MATERIALS PROVIDED

**DIL | SPE** *Diluent*, 40 mL, buffered protein solution + 0.02% thimerosal. The *Diluent* is also to be used as the negative control solution (see TEST PROCEDURE).

**CONJ | ENZ** *Conjugate*, 7 mL, mouse monoclonal antibody specific for toxin A coupled to horseradish peroxidase and goat polyclonal antibody specific for toxin B coupled to horseradish peroxidase in a buffered protein solution + 0.02% thimerosal

**SUBS | REAG** *Substrate*, 14 mL, solution containing tetramethylbenzidine and peroxide

CONTROL +

**Positive Control**, 3.5 mL, inactivated toxins in a buffered protein solution containing 0.02% thimerosal

WASHBUF 20X

**Wash Buffer Concentrate**, 50 mL, 20X concentrate containing phosphate-buffered saline, detergent, and 0.2% thimerosal

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6N

**Stop Solution**, 7 mL, 0.6N sulfuric acid. CAUTION: Avoid contact with skin; flush with water immediately if contact occurs.

MA PLT

**Microassay Plate**, 12 strips, each strip consisting of 8 wells, coated with affinity purified goat antibodies specific for toxins A and B (stored with desiccant)

**Wash Solution Label**, 1 label

**Applicator sticks**, 50 sticks

## ACCESSORIES

*Disposable plastic pipettes*, 100 pipettes

*Plastic adhesive sheets*, 2 sheets

## MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

*Wash bottle*

*Timer*

*Vortex mixer*

*Discard container*

*Distilled water*

*Tubes for dilution of specimen*

*Paper towels or absorbent sheets*

*Spectrophotometer* capable of reading dual wavelength at 450/620 nm or single wavelength at 450 nm (a dual wavelength plate reader is recommended; absorbances should be measured at 450 nm and referenced at 620 nm)

*Refrigerator* set between 2° and 8°C

*Incubator* set at 37°C ± 2°C

## SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date of the kit is given on the label. Expiration dates for each component are listed on the individual labels. The kit containing the reagents with designated shelf life should be stored between 2° and 8°C and should be returned to the refrigerator as soon as possible after use.

## PRECAUTIONS

1. Reagents from different kits should not be mixed. Do not use a kit past the expiration date.
2. Reagents should be at room temperature before use.
3. Caps and tips are color coded; do not mix!
4. When handling assay wells, avoid scratching the bottom of the wells because this may result in elevated absorbance readings.
5. Hold dropper bottles vertically to ensure proper drop size.
6. Handle specimens and used microassay wells as if capable of transmitting infectious agents. Wear gloves when doing the test.
7. Reagents contain 0.02% thimerosal as a preservative and should be handled with normal laboratory caution.
8. The *Stop Solution* contains 0.6N sulfuric acid. Flush with water immediately if contact occurs.
9. *Unused microwells must be placed back inside of the resealable pouch with the desiccant to protect them from moisture.*
10. Perform the washing procedure as directed to avoid high background reactions.
11. Use fecal specimens within 24 hours of collection to obtain optimal results. Specimens that are frozen (-20°C or lower) may lose activity due to freezing and thawing.
12. The *Substrate* is light sensitive and should be protected from direct sunlight or UV sources.
13. Optimal results are obtained by following the specified test procedure. The concentrations, incubation conditions, and processing specifications have been optimized for sensitivity and specificity. Alterations of the specified procedure and/or test conditions may affect the sensitivity and specificity of the test.

## COLLECTION AND HANDLING OF FECAL SPECIMENS

NOTE: *Standard collection and handling procedures used in-house for fecal specimens are appropriate. Specimens should be transported and diluted in the kit Diluent as*

**soon as possible.** Specimens should be stored between 2° and 8°C. Whenever possible, test samples which are less than 24 hours old. Store specimens at -20°C, or lower, if the test cannot be performed within 72 hours of collection (11). Freezing and thawing of the specimen, especially multiple times, may result in loss of activity due to degradation of the toxins. Fecal specimens that have been preserved in 10% Formalin, Merthiolate Formalin, Sodium Acetate Formalin, or Polyvinyl Alcohol cannot be used. Make sure that specimens are thoroughly mixed (vortexed) prior to performing the assay. This includes complete mixing of the specimen prior to transfer to Diluent as well as complete mixing of the diluted specimen prior to transfer to the microwell. The Diluent has been formulated to stabilize the toxins in fecal specimens and minimize degradation. Disposable pipettes which are included in the accessories are graduated at 50, 100, 200, and 300 µL. Specimens may be diluted in the optional STOOL-PREP™\* device (Cat.#T9015, see instructions for use) and stored between 2° and 8°C.

1. Set up one dilution tube for each specimen to be tested. Add 200 µL Diluent to each tube. Label the tube directly on the side.
2. For **formed fecal specimens**, use an applicator stick to transfer the fecal specimen to the tube. Transfer an amount equal to about 3 mm in diameter with the applicator stick to the Diluent. For **liquid fecal specimens**, use a plastic pipette to transfer 50 µL specimen to tube. Make sure the liquid specimens are evenly suspended before transferring.
3. Vortex the tubes for 10 seconds and store between 2° and 8°C until the ELISA is performed (within 72 hours of collection). Vortex again before transferring diluted specimen to microassay well. This ensures thorough mixing of the specimen.
4. Semi-automated washing equipment may be used with specimens that have been centrifuged (5000 x g for 10 minutes) to remove particulate matter.

#### PRELIMINARY PREPARATIONS

1. **IMPORTANT:** All reagents must be at room temperature prior to use in the assay.
2. Prepare 1X Wash Solution. The Wash Buffer Concentrate is supplied as a 20X concentrate (a precipitate may be noticed). It should be diluted to a total volume of 1 liter by adding 50 mL of the concentrate to 950 mL of distilled water. Label the bottle. Store any unused 1X Wash Solution between 2° and 8°C.
3. **Assay Strip Preparation.** Each strip contains 8 wells coated with affinity purified polyclonal antibodies specific for toxins A and B. Each specimen or control will employ one of these coated wells. Determine the number of wells to be used. Avoid contact with the base of the wells. Assay wells not used must be returned to the plastic bag and carefully resealed with desiccant.

#### TEST PROCEDURE

1. Add 1 drop (50 µL) of Conjugate (red cap) to each well. Be sure to hold each bottle vertically when adding the drops. Use 1 well for each fecal specimen, 1 well for the Positive Control and 1 well for the negative control (i.e., Diluent). Identification marks may be written directly on side of well.
2. Transfer 100 µL (2 drops using a transfer pipette from the accessory kit) of diluted specimen to the assay well; or if using a STOOL-PREP™\* device, add diluted specimen according to the STOOL-PREP™\* device instructions. Add 1 drop (50 µL) of the Positive Control (black cap) to the positive control well and 50 µL (1 drop using a transfer pipette from the accessory kit) of the negative control (i.e., Diluent) to the negative control well.
3. Cut the adhesive plastic sheet to the size necessary to cover the wells. Cover the wells and incubate them at 37°C ± 2°C for 50 minutes.
4. Shake out the contents of the assay wells into a discard pan.
5. Wash each well using the 1X Wash Solution in a squirt bottle with a fine-tipped nozzle, directing the Wash Solution to the bottom of the well with force. Fill the wells, then shake the Wash Solution out of the well into a discard pan. Slap the inverted plate on a dry paper towel and repeat step #5 **four times** using a dry paper towel each time. If any particulate matter is seen in the wells, continue washing until all the particulate matter is removed. **Note:** If using semi-automated or automated washing equipment,

specimens must be centrifuged (5000 x g for 10 minutes) to remove any particulate matter. Add 350  $\mu\text{L}$  of 1X *Wash Solution* to each well. Wash for a total of 5 times. If using optional *STOOL-PREP™* devices, wash the plate once by hand, slapping hard on dry paper towels and follow with 4 washes on an automated washer for a total of 5 washes. If any particulate matter is seen in the wells, continue washing until all the particulate matter is removed.

6. After washing, completely remove any residual liquid in the wells by striking the plate once again onto a dry paper towel until no liquid comes out. *Dispose of paper towels and specimen containers properly.*
7. Add 2 drops (100  $\mu\text{L}$ ) of *Substrate* (blue cap) to each well. Gently tap the wells to mix the substrate. Incubate the wells at room temperature for 10 minutes. Gently tap the wells at 5 minutes.
8. Add 1 drop (50  $\mu\text{L}$ ) of *Stop Solution* (yellow cap) to each well. Gently tap the wells and wait 2 minutes before reading. The addition of the *Stop Solution* converts the blue color to a yellow color which may be quantitated by measuring the optical density at 450 nm on a microplate ELISA reader. The instrument should be blanked against air. If a dual wavelength reader is used, blank against air at 620 and read at 450 nm. Wipe the underside of each well before measuring the optical density. If an ELISA reader is unavailable, the test may be read visually in good light against a white background. Read within ten minutes after adding *Stop Solution*.

#### ALTERNATE TEST PROCEDURE/RAPID FORMAT

Perform the regular test procedure according to the instructions provided above replacing the 50 minute incubation at  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  with 20 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$  using the *Stat Fax 2200 Incubator/Shaker* or equivalent incubator/shaker. If the *Stat Fax 2200 Incubator/Shaker* is used, set the shaker to speed 7 and the temperature to  $37^{\circ}\text{C}$ . If other shakers are used, a speed of 1500 rpm is recommended. Shaking should not cause spillage. If spillage occurs, reduce the speed accordingly (11).

#### QUALITY CONTROL

1. A positive and negative control must be run with each series of test specimens.
2. Positive and negative controls must fall within their respective ranges or the test is not valid.
  - a) Positive Control must be a visible yellow color. If read on a spectrophotometer, the OD at 450 nm or using dual wavelength at 450/620 nm must be  $\geq 0.500$ .
  - b) Negative Control must be visually clear. If read on a spectrophotometer, the OD at 450 nm must be  $< 0.120$ . If read at 450/620 nm the absorbance must be  $< 0.080$ .
3. Wells that are clear visually but give absorbance  $\geq 0.120$  should be wiped on the underside and remeasured.
4. Visual readings must be taken in good light against a white background.
5. A sample that yields a weak positive result (i.e.,  $< 0.200$ ) and is adjacent to a strong positive should be repeated to assure carryover did not occur.

#### INTERPRETATION OF RESULTS

##### 1. Visual Reading

Negative = Colorless

Positive = Any yellow color

##### 2. Spectrophotometric Single Wavelength at 450 nm

Negative = OD  $< 0.120$

Positive = OD  $\geq 0.120$

##### 3. Spectrophotometric Dual Wavelength at 450/620 nm

Negative = OD  $< 0.080$

Positive = OD  $\geq 0.080$

A positive test result indicates that *C. difficile* toxin A and/or toxin B are present in the fecal specimen.

#### LIMITATIONS OF THE *C. DIFFICILE TOX A/B II™* TEST

1. The *C. DIFFICILE TOX A/B II™* test is used to detect *C. difficile* toxin in fecal speci-

mens. The test confirms the presence of toxin in feces and this information should be taken under consideration by the physician in light of the clinical history of the patient. Inability to detect toxin A or B in fecal samples from patients suspected of having *C. difficile* disease may not preclude actual disease but may be caused by other factors (i.e., incorrect specimen collection, handling and/or storage, toxin levels lower than the kit detection limits). The *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ test will detect Toxin A at levels  $\geq 0.8$  ng/mL and Toxin B at levels  $\geq 2.5$  ng/mL.

2. Fecal specimens represent an extremely complex clinical specimen. Optimal results with the *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ test are obtained with specimens that are less than 24 hours old. Most specimens can be stored between 2° and 8°C for 72 hours before significant degradation of the toxin is noted. If specimens are not assayed within this time period, they may be frozen and thawed. However, freezing and thawing, especially multiple times, may cause specimens to lose their activity due to degradation of the toxin.
3. Some specimens may give weak reactions. This may be due to a number of factors such as the presence of a weakly toxigenic strain, low levels of toxin production *in vivo*, or the presence of binding substances or inactivating enzymes in the feces. *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 *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ test include isolation of the organism on selective media, latex agglutination assay for the detection of *C. difficile* (the organism), or tissue culture cytotoxicity assay for the detection of *C. difficile* toxin. The isolation of the organism does not confirm that it is toxigenic. This must be confirmed by additional testing of the isolate using either the ELISA or tissue culture assay to demonstrate toxigenicity. Likewise, the latex agglutination assay, which detects a nontoxic protein of *C. difficile*, does not demonstrate the presence of toxigenic *C. difficile*.
4. Certain toxigenic isolates of *Clostridium sordellii* produce toxins that are similar in their biologic, physicochemical and immunologic properties to the toxins of *C. difficile*. These isolates, however, have not been detected in patients with antibiotic-associated diarrhea and colitis.
5. Fecal specimens that have been preserved in 10% Formalin, Merthiolate Formalin, Sodium Acetate Formalin, or Polyvinyl Alcohol cannot be used.
6. The performance characteristics of the *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ test have not been thoroughly established in the pediatric population.

## EXPECTED VALUES

The prevalence of a positive *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* plus positive tissue culture and/or toxigenic culture was 5.4% in one study and 8.6% in another study. The prevalence will vary from location to location and hospitals may experience rates lower or higher than those observed at the sites used in the *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* evaluation.

*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 because some healthy adults and large numbers of healthy infants (up to 50%) will be positive for *C. difficile* toxin (toxin-positive by either tissue culture or ELISA). In addition, *C. difficile* carriage rates of 22% to 32% have been reported in cystic fibrosis patients (12-14).

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Clinical evaluation

The *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* was compared with the tissue culture test at four U.S. hospitals and in-house at TECHLAB®, Inc. Specimens included in the evaluation were submitted to the clinical laboratory for routine testing. The tissue culture test was done according to the in-house procedure. Table 1 shows a comparison of the *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* with tissue culture. Of the 1,152 specimens included in the evaluation, approximately 3.6% were from children  $\leq 2$  years of age. No *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* (+)/tissue culture (-) specimens were identified. Overall, the sensitivity for the *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* ranged from 83.3% to 96% (confidence interval of 87.4 to 95.0,  $p=0.05$ ). The specificity was 100% in all studies. The predictive positive value was 100% in all studies and the predictive negative value ranged from 90% to 99.5% (confidence



interval of 93.8 to 99.8,  $p=0.05$ ). The correlation ranged from 94.9% to 99.5% (confidence interval of 96.6 to 99.4,  $p=0.05$ ).

**TABLE 1** Correlation of *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* with Tissue Culture (n=1,152).

	Tissue Culture positive	Tissue Culture negative
<i>C. DIFFICILE TOX A/B TEST</i> positive	165	0
<i>C. DIFFICILE TOX A/B TEST</i> negative	14	973
Sensitivity	92.2%	
Specificity	100%	
Correlation	98.8%	
Predictive Positive Value	100%	
Predictive Negative Value	98.6%	

### In-house comparison

In a study performed in-house the *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ test was compared to the *C. DIFFICILE TOX A/B TEST*. In the study, 218 clinical specimens representative of those routinely submitted to the clinical laboratory for *C. difficile* testing were evaluated. The results obtained with both tests were comparable.

### Centrifugation

A total of 337 fecal specimens, including 30 positives and 307 negatives, were evaluated to determine the effect of centrifugation on performance. For the analysis, specimens were diluted and vortexed as described in the package insert. The specimens were centrifuged (5,000 x g) to remove insoluble material and the supernatant fluid was assayed in the *C. DIFFICILE TOX A/B TEST*. Results were compared to results obtained with the same panel of diluted and vortexed specimens that had not been centrifuged. The results demonstrated a correlation of 100% between centrifuged and noncentrifuged specimens.

### CROSS-REACTIVITY

Various organisms were examined for cross-reactivity in the *C. DIFFICILE TOX A/B TEST*. For the analysis, broth cultures mixed with *Diluent* were evaluated. Broth cultures at log phase containing  $>10^8$  bacteria per mL were used. A listing of the organisms that did not react under any of the conditions is shown in Table 2. The only organisms that reacted were toxigenic *C. difficile* and a toxigenic strain of *C. sordellii* (VPI strain 9048) which produces toxins that crossreact significantly with *C. difficile* toxins. A nontoxigenic strain of *C. sordellii* that does not produce toxin HT was negative in the test. *C. sordellii* has not been implicated in pseudomembranous colitis or antibiotic-associated diarrhea. The strains of toxigenic *C. difficile* that were analyzed included six toxigenic strains that ranged from weakly to highly toxigenic and two nontoxigenic strains. The *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* detected all six of the toxigenic strains and did not react with the two nontoxigenic strains.

**TABLE 2** Organisms that do not react in the *C. DIFFICILE TOX A/B TEST*

<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Clostridium novyi</i> (Types A, B, C)	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i> (Types A-E)	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacteroides fragilis</i> (toxigenic/nontoxigenic)	<i>Clostridium sordellii</i> (nontoxigenic)	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Clostridium spiroforme</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Protein A-negative)
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Clostridium tetani</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Protein A-positive @ $<10^8$ )
<i>Clostridium bifermantans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium botulinum</i> (Types A-G)	<i>Escherichia coli</i> (enterohemorrhagic)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Clostridium difficile</i> (nontoxigenic)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	

### EFFECT OF FECAL SAMPLE CONSISTENCY

The reactions of fecal samples of varying consistencies in the *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* and tissue culture assay are shown in Table 3. The rates of positive reactions were similar in all three types of fecal specimens. All of the specimens were submitted for *C. difficile* testing. The basis for submission is the clinical history of the patient and not the consistency of the specimen. In additional studies, highly purified toxin A and toxin B were used to spike liquid, semi-solid, and solid fecal specimens.

TABLE 3 Effect of sample consistency

Test	Liquid Samples	Semi-Solid Samples	Solid Samples
Number of specimens (n=435)	150	133	152
<i>C. DIFFICILE TOX A/B TEST</i> Positive	13 (8.7%)	11 (8.3%)	13 (8.6%)
Tissue Culture Positive	13 (8.7%)	14 (10.5%)	15 (9.9%)

The *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* detected toxins A and B in liquid, semi-solid and solid fecal specimens at levels similar to those observed with toxin A and toxin B prepared in kit *Diluent*.

### REPRODUCIBILITY AND PRECISION

Five fecal specimens (one negative specimen and four positive specimens) were sent to four independent laboratories for analysis using the *C. DIFFICILE TOX A/B TEST*. All specimens were kept frozen until the assay was performed. The results from each laboratory were compared with in-house results and found to be identical. The four positive specimens were confirmed positive and the negative specimen was confirmed negative at each site.

The intraassay coefficient of variation (CV) of the *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* was determined by analyzing 32 positive and 32 negative control reactions along with 8 negative fecal specimens. Each fecal specimen was tested in 11 wells. The intraassay %CV was 7.190 with the positive control, 6.557 with the negative control, and 9.697 with the fecal specimens. The interassay CV was determined using four positive and one negative fecal specimens tested at time 0, 24, 48, and 72 hours. The %CV ranged from 9.9 to 29.6, with an average of 16.3.



## C. DIFFICILE TOX A/B II™ - ESPAÑOL

### USO INDICADO

La prueba *C. DIFFICILE TOX A/B II™* es un enzimoimmunoanálisis para la detección de las toxinas A y B producidas por cepas toxigénicas de *Clostridium difficile*. Puede utilizarse para detectar toxinas A y B en muestras fecales de personas en las que se sospecha una enfermedad causada por *C. difficile*. 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

Después del tratamiento con antibióticos, muchos pacientes sufren problemas gastrointestinales que varían entre diarrea leve y colitis pseudomembranosa grave. Una gran parte de los casos más leves de enfermedad gastrointestinal y la mayoría de los casos de colitis pseudomembranosa están causados por *Clostridium difficile* (1). Este microorganismo es una bacteria anaerobia oportunista que crece en el intestino cuando la flora normal es alterada por un antibiótico. La enfermedad está causada por las toxinas que produce el microorganismo. Se cree que los síntomas clínicos asociados a la enfermedad están causados principalmente por la toxina A, una enterotoxina que lesiona los tejidos (2,3). *Clostridium difficile* también produce una segunda toxina, denominada toxina B. La toxina B, a la que se denomina la citotoxina del microorganismo, se detecta mediante los análisis de cultivos tisulares utilizados actualmente en numerosos laboratorios. La mayoría de las cepas producen ambas toxinas o no producen ninguna toxina, aunque recientemente se han identificado cepas que sólo producen la toxina B (4,5). Estas cepas que sólo producen la toxina B generan un resultado positivo en la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B II™* (6,7).

Las cepas de *Clostridium difficile* que producen niveles altos de toxina A también producen niveles altos de toxina B. Asimismo, las cepas que producen niveles bajos de toxina A producen niveles bajos de toxina B, lo que indica que la regulación de la producción de las toxinas podría ser similar. Se están utilizando pruebas que detectan una o ambas toxinas como herramientas de ayuda diagnóstica. Se han clonado y secuenciado los genes de las toxinas, y actualmente se conocen bien algunas de las propiedades de las toxinas (8,9). Ambas toxinas son grandes ( $M_r$  de la toxina A, 308.000;  $M_r$  de la toxina B, 279.000). La toxina A presenta una compleja serie de unidades repetidas en el extremo COOH de la molécula y es muy probable que estas unidades repetidas actúen como fragmento de unión que reconoce los receptores que contienen galactosa (10). Algunos datos sugieren que las toxinas A y B actúan sinérgicamente y que la lesión tisular inicial causada por la toxina A permite a la toxina B ejercer su toxicidad. Por consiguiente, aunque se cree que la toxina A causa la mayoría de los signos clínicos, la toxina B también podría tener una función importante en la enfermedad.

### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba *C. DIFFICILE TOX A/B II™* utiliza anticuerpos frente a las toxinas A y B de *Clostridium difficile*. Los pocillos de microanálisis suministrados con el kit contienen anticuerpos policlonales de cabra inmovilizados y purificados por afinidad frente a las toxinas A y B. El anticuerpo detector es una mezcla de anticuerpo monoclonal de ratón frente a la toxina A conjugado con peroxidasa de rábano picante y de anticuerpo policlonal de cabra frente a la toxina B conjugado con peroxidasa de rábano picante. En el análisis, se emulsiona una parte alícuota de una muestra fecal en el *Diluyente* y, posteriormente, la muestra diluida se transfiere al pocillo de microanálisis que contiene el anticuerpo detector. Si la muestra contiene toxinas A y B, se unirán al anticuerpo detector y al anticuerpo policlonal inmovilizado durante la fase de incubación. Cualquier material no unido se elimina durante los pasos de lavado. Tras la adición de un sustrato, se detecta un color debido a los complejos enzima-anticuerpo-antígeno que se forman en presencia de la toxina.

**MATERIALES PROVISTOS**

**DIL | SPE** **Diluyente**, 40 ml – Solución de proteína tamponada con tiomersal al 0,02%. El *Diluyente* también se usa como solución de control negativo (véase PROCEDIMIENTO DE PRUEBA).

**CONJ | ENZ** **Conjugado**, 7 ml – Anticuerpo monoclonal de ratón específico para la toxina A unido a peroxidasa de rábano picante y anticuerpo policlonal de cabra específico para la toxina B unido a peroxidasa de rábano picante en una solución de proteínas tamponada con tiomersal al 0,02%.

**SUBS | REAG** **Substrato**, 14 ml – Solución que contiene tetrametilbenzidina y peróxido.

**CONTROL | +** **Control Positivo**, 3,5 ml – Toxinas inactivadas en una solución tamponada de proteínas que contiene tiomersal al 0,02%.

**WASHBUF | 20X** **Tampón de lavado concentrado**, 50 ml – Concentrado 20x que contiene suero fisiológico tamponado con fosfato, detergente y tiomersal al 0,2%.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> | 0.6N** **Solución de Parada**, 7 ml – Ácido sulfúrico 0,6N. ATENCIÓN: evite el contacto con la piel; aclarar con agua inmediatamente en caso de contacto.

**MA | PLT** **Placa para microanálisis**, 12 tiras, 8 pocillos por cada tira, recubiertos con anticuerpos de cabra purificados por afinidad específicos para las toxinas A y B (conservados con desecante)

**Etiqueta de la solución de lavado**, 1 etiqueta

**Varillas aplicadoras**, 50 varillas

**ACCESORIOS**

*Pipetas de plástico desechables*, 100 pipetas *Hojas adhesivas de plástico*, dos hojas

**MATERIALES Y EQUIPAMIENTO NECESARIOS NO SUMINISTRADOS**

*Frasco de lavado*

*Cronómetro*

*Mezclador de tipo vórtex*

*Contenedor desechable*

*Agua destilada*

*Tubos para la dilución de las muestras*

*Compresas de papel o láminas absorbentes*

*Espectrofotómetro* capaz de leer una longitud de onda doble de 450/620 nm o una longitud de onda única a 450 nm (se recomienda un lector de placa de longitud de onda doble; las absorbancias se deben leer a 450 nm con referencia a una longitud de onda de 620 nm)

*Frigorífico* a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C.

*Incubadora* a 37 ± 2°C

**PERÍODO DE VALIDEZ Y CONSERVACIÓN**

La fecha de caducidad del kit se indica en la etiqueta. Las fechas de caducidad de cada componente se indican en las etiquetas individuales. El kit que contiene los reactivos con el período de validez indicado debe conservarse entre 2° y 8°C y debe devolverse al frigorífico tan pronto como sea posible después de su uso.

**PRECAUCIONES**

1. No deben mezclarse los reactivos de kits diferentes. No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
2. Los reactivos estarán a temperatura ambiente antes de su uso.
3. Los tapones y las puntas están codificados por colores y no deben mezclarse.
4. Cuando se manipulen pocillos de ensayo, evitar el rascado del fondo de los pocillos, ya que esto podría causar lecturas de absorbancia elevadas.
5. Sostenga los frascos del gotero verticalmente para garantizar un tamaño de gota adecuado.
6. Manipular las muestras y los pocillos de microanálisis utilizados como potenciales transmisores de agentes infecciosos. Utilizar guantes para realizar la prueba.
7. Los reactivos contienen timerosal al 0,02% como conservante y se manipularán según las normas habituales de precaución de laboratorio.
8. La *Solución de Parada* contiene ácido sulfúrico 0,6N. Aclarar inmediatamente con agua si se produce el contacto.
9. *Los micropocillos no utilizados se introducirán en la bolsa resellable junto con el desecante para protegerlos de la humedad.*
10. Efectuar el procedimiento de lavado tal como se indica para evitar reacciones de fondo elevadas.

11. 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.
12. El *Substrato* es sensible a la luz y debe protegerse de la luz solar directa o de fuentes de UV.
13. Se obtienen resultados óptimos siguiendo el procedimiento analítico especificado. Las concentraciones, las condiciones de incubación y las especificaciones de procesamiento están optimizadas para la sensibilidad y la especificidad de la prueba. Las alteraciones del procedimiento especificado y/o de las condiciones de la prueba pueden afectar a su sensibilidad y especificidad.

## RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS FECALES

**NOTA:** *Los procedimientos internos estándar de recogida y transporte de las muestras fecales son adecuados. Las muestras deben transportarse y diluirse con el Diluyente del kit lo antes posible. Las muestras deben conservarse a una temperatura comprendida entre  $2^{\circ}$  y  $8^{\circ}\text{C}$ . Siempre que sea posible, las muestras se procesarán en las 24 horas posteriores a su recogida. Conservar las muestras congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  o a temperatura inferior si la prueba no puede realizarse en las 72 horas siguientes a la recogida de la muestra (11). La congelación y descongelación de la muestra, sobre todo cuando se realiza varias veces, puede provocar una pérdida de actividad por la degradación de las toxinas. No pueden utilizarse muestras fecales conservadas en formol al 10%, formol mertiolato, formol acetato sódico o alcohol polivinílico. Es preciso asegurarse de que las muestras estén completamente mezcladas (con el vórtex) antes de realizar el análisis. Esto incluye el mezclado completo de la muestra antes de su transferencia al Diluyente, así como el mezclado completo de la muestra diluida antes de su transferencia al micropocillo. El Diluyente se ha formulado para estabilizar las toxinas presentes en muestras fecales y reducir al mínimo su degradación. Las pipetas desechables que incluye el kit como accesorios están graduadas a 50, 100, 200 y 300  $\mu\text{l}$ . Las muestras pueden diluirse con STOOL-PREP™\* (n.º de catálogo T9015, consulte las instrucciones de uso) y conservarse entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$ .*

1. Asignar un tubo de dilución para cada muestra que se vaya a analizar. Añadir 200  $\mu\text{l}$  de Diluyente a cada tubo. Etiquetar el tubo directamente en el lateral.
2. Para las **muestras fecales sólidas**, utilizar una varilla aplicadora para transferir la muestra fecal al tubo. Transferir una cantidad de aproximadamente 3 mm de diámetro con la varilla aplicadora al tubo con Diluyente. Para las **muestras fecales líquidas**, utilizar una pipeta de plástico para transferir 50  $\mu\text{l}$  de la muestra al tubo. Es preciso asegurarse de obtener una suspensión homogénea de las muestras líquidas antes de transferirlas.
3. Mezclar con un vórtex los tubos durante 10 segundos y almacenarlos a una temperatura comprendida entre  $2^{\circ}$  y  $8^{\circ}\text{C}$  hasta que realice el ELISA (en las 72 horas posteriores a la recogida). Volver a mezclar en un vórtex antes de transferir la muestra diluida al pocillo de microanálisis. De esta forma se garantiza que la muestra se mezcla bien.
4. Se puede utilizar un equipo de lavado semiautomático para eliminar las partículas restantes en las muestras centrifugadas (5000 x g durante 10 minutos).

## PREPARACIONES PRELIMINARES

1. **IMPORTANTE:** Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de su uso en el análisis.
2. Preparar la *Solución de lavado* 1x. El *Tampón de lavado concentrado* se suministra como concentrado 20x (se puede apreciar un precipitado). Se debe diluir hasta un volumen total de 1 litro añadiendo 50 ml del concentrado y 950 ml de agua destilada. Etiquetar el frasco. Conservar la *Solución de lavado* 1x no utilizada a una temperatura comprendida entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$ .
3. **Preparación de la tira a analizar.** Cada tira contiene 8 pocillos recubiertos con anticuerpos policlonales purificados por afinidad específicos para las toxinas A y B. Se utilizará uno de estos pocillos recubiertos para cada muestra o control. Determinar el número de pocillos que se va a utilizar. Evite el contacto con la base de los pocillos. Los

pocillos de análisis no utilizados deben devolverse a la bolsa de plástico y resellarse con cuidado con desecante.

### PROCEDIMIENTO DEL TEST

1. Añadir 1 gota (50 µl) de *Conjugado* (tapón rojo) a cada pocillo. Asegurarse de sostener el frasco en posición vertical cuando añada las gotas. Utilice un pocillo para cada muestra fecal, un pocillo para el *Control Positivo* y un pocillo para el control negativo (p. ej., *Diluyente*). Se pueden realizar marcas de identificación directamente en el lateral del pocillo.
2. Transferir 100 µl (2 gotas utilizando la pipeta del kit de accesorios) de la muestra diluida al pocillo de análisis; si se utiliza *STOOL-PREP<sup>TM</sup>\**, añadir la muestra diluida siguiendo las instrucciones del dispositivo *STOOL-PREP<sup>TM</sup>\**. Añadir 1 gota (50 µl) del *Control Positivo* (tapón negro) al pocillo del control positivo y 50 µl (1 gota utilizando la pipeta del kit de accesorios) del control negativo (p. ej., *Diluyente*) al pocillo del control negativo.
3. Recortar la hoja adhesiva de plástico al tamaño necesario para cubrir los pocillos. Cubrir los pocillos e incubarlos a 37°C ± 2°C durante 50 minutos.
4. Vaciar el contenido de los pocillos de análisis a un contenedor de desechos.
5. Lavar cada pocillo con la *Solución de lavado* 1x en un frasco con rociador con boquilla de punta fina, dirigiendo con fuerza la *Solución de lavado* al fondo del pocillo. Llenar los pocillos y a continuación transferir la *Solución de lavado* de los pocillos a un contenedor de desechos. Golpear la placa invertida sobre una compresa de papel seca y repetir **cuatro veces** el paso 5 utilizando una compresa de papel seca cada vez. Si se observan partículas en los pocillos, seguir lavando hasta que se elimine esta materia. **Nota:** si se utiliza un equipo de lavado semiautomático o automático, se deben centrifugar las muestras (5000 x g durante 10 minutos) para eliminar las partículas. Añadir 350 µl de la *Solución de lavado* 1x a cada pocillo. Lavar un total de 5 veces. Si se utiliza el producto opcional *STOOL-PREP<sup>TM</sup>\**, lavar la placa una vez a mano, golpeando con fuerza sobre compresas de papel secas, y continuar con 4 lavados en una lavadora automática para alcanzar un total de 5 lavados. Si se observan partículas en los pocillos, seguir lavando hasta que se elimine esta materia.
6. Después del lavado, retirar completamente cualquier líquido residual de los pocillos golpeando de nuevo la placa sobre una compresa de papel seca hasta que no salga más líquido. *Eliminar adecuadamente las compresas de papel y los contenedores de muestras.*
7. Añadir dos gotas (100 µl) de *Substrato* (tapón azul) a cada pocillo. Percutir suavemente los pocillos para mezclar el substrato. Incubar los pocillos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Percutir suavemente los pocillos a los 5 minutos.
8. Añadir una gota (50 µl) de *Solución de parada* (tapón amarillo) a cada pocillo. Percutir suavemente los pocillos y esperar 2 minutos antes de la lectura. La adición de la *Solución de parada* convierte el color azul en amarillo, lo que puede cuantificarse determinando la densidad óptica a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA. El instrumento debe calibrarse con aire. Si se utiliza un lector de longitud de onda doble, calibrar con aire a 620 nm y leer a 450 nm. Antes de determinar la densidad óptica, limpiar la parte inferior de cada pocillo para retirar la humedad. Si no se dispone de un lector de placas de ELISA, la prueba se puede leer visualmente en condiciones de iluminación adecuadas frente a un fondo blanco. Leer a los 10 minutos de añadir la *Solución de parada*.

### PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO DEL TEST / FORMATO RÁPIDO

Realizar el procedimiento habitual de la prueba siguiendo las instrucciones antes proporcionadas sustituyendo la incubación de 50 minutos a 37°C ± 2°C por 20 minutos a 37°C utilizando el *Incubador/Agitador Stat Fax 2200* o un aparato equivalente. Si se utiliza el *Incubador/Agitador Stat Fax 2200*, seleccionar la velocidad 7 del agitador y fijar la temperatura en 37°C. Se recomienda una velocidad de 1500 rpm si se utilizan otros agitadores. La agitación no debe producir derramamiento. Si se produce algún vertido, reduzca la velocidad (11).

## CONTROL DE CALIDAD

1. Se efectuarán un control positivo y un control negativo con cada serie de muestras problema.
2. Los controles positivo y negativo deben estar dentro de sus rangos respectivos o la prueba no será válida.
  - a) El control positivo debe tener un color amarillo visible. Si se lee en un espectrofotómetro, la OD a 450 nm o a 450/620 nm (cuando se utiliza longitud de onda doble) debe ser  $\geq 0,500$ .
  - b) El control negativo debe ser transparente. Si se lee en un espectrofotómetro, la OD a 450 nm debe ser  $< 0,120$ . Si se lee a 450/620 nm, la absorbancia debe ser  $< 0,080$ .
3. En los pocillos que parecen transparentes pero que tienen una absorbancia  $\geq 0,120$  se debe limpiar la parte inferior de los mismos y repetir su lectura.
4. Las lecturas visuales se deben realizar en condiciones adecuadas de iluminación frente a un fondo blanco.
5. Para garantizar que no se ha producido ningún efecto de arrastre, debe repetirse el análisis de las muestras que den resultados débilmente positivos (p. ej.,  $< 0,200$ ) y que estén adyacentes a otra con resultado fuertemente positivo.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 1. Lectura visual

Negativo = Incoloro

Positivo = Cualquier tonalidad amarilla

### 2. Espectrofotómetro con longitud de onda única a 450 nm

Negativo = OD  $< 0,120$

Positivo = OD  $\geq 0,120$

### 3. Espectrofotómetro con longitud de onda doble a 450/620 nm

Negativo = OD  $< 0,080$

Positivo = OD  $\geq 0,080$

Un resultado positivo de la prueba indica que la muestra fecal contiene toxina A y/o B de *C. difficile*.

## LIMITACIONES DE LA PRUEBA *C. DIFFICILE TOX A/B II™*

1. La prueba *C. DIFFICILE TOX A/B II™* se utiliza para detectar toxinas de *C. difficile* en muestras fecales. La prueba confirma la presencia de toxina en heces y esta información debe ser tenida en cuenta por el médico junto con la anamnesis del paciente. La incapacidad para detectar la toxina A o B en muestras fecales de pacientes en los que se sospecha una enfermedad causada por *C. difficile* no excluye la existencia de enfermedad, ya que puede deberse a otros factores (p. ej., técnica de recogida, manipulación y/o conservación de la muestra incorrectas, niveles de toxina por debajo del límite de detección del kit). La prueba *C. DIFFICILE TOX A/B II™* detectará niveles de toxina A  $\geq 0,8$  ng/ml y niveles de toxina B  $\geq 2,5$  ng/ml.
2. Las muestras fecales son un tipo de muestra clínica extremadamente complejo. Los resultados óptimos de la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B II™* se obtienen con muestras recogidas en las 24 horas previas. La mayoría de las muestras pueden conservarse entre 2 y 8 °C durante 72 horas antes de que se produzca una degradación significativa de las toxinas. Si las muestras no se pueden analizar en este período de tiempo, se pueden congelar y descongelar después. Sin embargo, si las muestras se congelan y descongelan, especialmente cuando esto se hace varias veces, puede desaparecer su actividad debido a la degradación de la toxina.
3. En algunas muestras pueden obtenerse reacciones débilmente positivas. Esto puede deberse a diversos factores como la presencia de una cepa de baja toxigenicidad, niveles bajos de producción de toxina *in vivo* o la presencia de sustancias fijadoras o enzimas inactivadoras en las heces. *En estas condiciones, debe repetirse el análisis de la muestra o debe analizarse una muestra fresca.* Otras pruebas que pueden utilizarse junto con *C. DIFFICILE TOX A/B II™* son el aislamiento del microorganismo en medios selectivos, una prueba de aglutinación con látex para la detección de *C. difficile* (el microorganismo) o pruebas de citotoxicidad en cultivos tisulares para la detección

de la toxina de *C. difficile*. El aislamiento del microorganismo no confirma que sea toxigénico. Este extremo deberá confirmarse mediante pruebas adicionales del aislado, bien un ELISA o bien análisis de cultivos tisulares para demostrar la toxigenicidad.

Asimismo, la prueba de aglutinación con látex, que detecta una proteína no tóxica de *C. difficile*, no demuestra la presencia de *C. difficile* toxigénico.

4. Algunos aislados toxigénicos de *Clostridium sordellii* producen toxinas con propiedades biológicas, fisicoquímicas o inmunológicas similares a las de las toxinas de *C. difficile*. Sin embargo, estos aislados no se han detectado en pacientes con colitis y diarrea asociada a antibióticos.
5. No pueden utilizarse muestras fecales conservadas en formol al 10%, formol mertiolato, formol acetato sódico o alcohol polivinílico.
6. No se han establecido definitivamente las características de rendimiento de la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ en la población pediátrica.

## VALORES ESPERADOS

La prevalencia de un resultado positivo en la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* con cultivo tisular y/o cultivo toxigénico positivo fue del 5,4% en un estudio y del 8,6% en otro. La prevalencia variará de un lugar a otro, y es posible que los hospitales presenten tasas inferiores o superiores a las observadas en los centros en los que se realizó la evaluación de la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST*. La enfermedad que provoca *Clostridium difficile* es, sobre todo, una enfermedad nosocomial que afecta a pacientes de edad avanzada y los hospitales con mayor número de pacientes ancianos pueden observar tasas más elevadas. Es importante interpretar cualquier resultado junto con los síntomas clínicos, porque en algunos adultos sanos y un gran número de niños sanos (hasta el 50%) se obtienen resultados positivos para la toxina de *C. difficile* (resultado positivo por cultivo tisular o ELISA). Además, en pacientes con fibrosis quística se han descrito tasas de portadores de *C. difficile* de entre el 22% y el 32% (12-14).

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

### Evaluación clínica

Se comparó la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* con cultivos tisulares en cuatro hospitales de Estados Unidos e internamente en TECHLAB®, Inc. Las muestras incluidas en la evaluación se remitieron al laboratorio clínico para su análisis rutinario. La prueba de los cultivos tisulares se realizó de acuerdo con el protocolo interno. En la Tabla 1 se muestra una comparación de la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* con el cultivo tisular. De las 1.152 muestras incluidas en la evaluación, aproximadamente el 3,6% procedían de niños ≤ 2 años de edad. No se identificó ninguna muestra con resultado positivo en la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* y resultado negativo en el cultivo tisular. Globalmente, la sensibilidad de la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* osciló entre el 83,3% y el 96% (intervalo de confianza de 87,4 a 95,0, p=0,05). La especificidad fue del 100% en todos los estudios. El valor predictivo positivo fue del 100% en todos los estudios y el valor predictivo negativo osciló entre el 90% y el 99,5% (intervalo de confianza de 93,8 a 99,8, p=0,05). La correlación estuvo osciló entre el 94,9% y el 99,5% (intervalo de confianza de 96,6 a 99,4, p=0,05).

**TABLA 1** Correlación de la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* con el cultivo tisular (n=1.152).

	Cultivo tisular positivo	Cultivo tisular negativo
<i>C. DIFFICILE TOX A/B TEST</i> positivo	165	0
<i>C. DIFFICILE TOX A/B TEST</i> negativo	14	973
Sensibilidad	92.2%	
Especificidad	100%	
Correlación	98.8%	
Valor predictivo positivo	100%	
Valor predictivo negativo	98.6%	



## Comparación interna

En un estudio interno se comparó la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ con la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST*. Se evaluaron 218 muestras clínicas representativas de las que se envían de forma rutinaria al laboratorio clínico para la determinación de *C. difficile*. Los resultados obtenidos con ambas pruebas fueron comparables.

## Centrifugación

Se evaluó un total de 337 muestras fecales, con 30 positivas y 307 negativas, para determinar el efecto de la centrifugación sobre el rendimiento. Para el análisis, las muestras se diluyeron y mezclaron con vórtex tal y como se describe en el prospecto. Se centrifugaron las muestras (5000 x g) para eliminar el material insoluble y se analizó el líquido sobrenadante con la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST*. Los resultados se compararon con los obtenidos en el mismo grupo de muestras diluidas y mezcladas (con vórtex) que no habían sido centrifugadas. Los resultados demostraron una correlación del 100% entre las muestras centrifugadas y no centrifugadas.

## REACTIVIDAD CRUZADA

Se evaluó la reactividad cruzada de la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* con varios organismos. En el análisis se evaluaron cultivos de caldo mezclados con *Diluyente*. Se utilizaron cultivos de caldo en fase logarítmica que contenían >10<sup>8</sup> bacterias por ml. En la Tabla 2 se muestra una lista de los microorganismos no reactivos bajo ninguna condición. Los únicos microorganismos reactivos fueron cepas toxigénicas de *C. difficile* y una cepa toxigénica de *C. sordellii* (VPI cepa 9048), que produce toxinas con una reactividad cruzada considerable con las toxinas de *C. difficile*. Se obtuvo un resultado negativo con una cepa no toxigénica de *C. sordellii* que no produce toxina HT. *C. sordellii* no se ha relacionado con la colitis pseudomembranosa ni con la diarrea asociada a antibióticos. Las cepas de *C. difficile* analizadas fueron seis cepas con una toxigenicidad de nivel bajo a elevado y con dos cepas no toxigénicas. La prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* detectó las seis cepas toxigénicas y no reaccionó con las dos cepas no toxigénicas.

TABLA 2 Microorganismos sin reactividad en la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST*

<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Clostridium novyi</i> (Types A, B, C)	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i> (Types A-E)	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Clostridium sordellii</i> (nontoxigenic)	<i>Shigella flexneri</i>
(toxigenic/nontoxigenic)	<i>Clostridium spiroforme</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Clostridium tetani</i>	(Protein A-negative)
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Escherichia coli</i>	(Protein A-positive @ <10 <sup>8</sup> )
<i>Clostridium botulinum</i> (Types A-G)	<i>Escherichia coli</i> (enterohemorrhagic)	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Clostridium difficile</i> (nontoxigenic)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	

## EFEECTO DE LA CONSISTENCIA DE LA MUESTRA FECAL

En la Tabla 3 se muestran las reacciones de las muestras fecales de diferentes consistencias con la prueba *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* y los análisis de cultivos celulares. Los porcentajes de reacciones positivas fueron similares en los tres tipos de muestras fecales. Todas las muestras se remitieron para el análisis de *C. difficile*. El motivo de la realización de la prueba en las muestras era la anamnesis del paciente, con independencia de la consistencia de las muestras. En otros estudios se ha utilizado toxina A y toxina B muy purificada para evaluar las muestras fecales sólidas, semisólidas y líquidas.



TABLA 3 Efecto de la consistencia de la muestra

Prueba	Muestras líquidas	Muestras semisólidas	Muestras sólidas
Número de muestras (n=435)	150	133	152
C. <i>DIFFICILE TOX A/B TEST</i> positivo	13 (8,7%)	11 (8,3%)	13 (8,6%)
Cultivo tisular positivo	13 (8,7%)	14 (10,5%)	15 (9,9%)

La prueba C. *DIFFICILE TOX A/B TEST* detectó la toxina A y la toxina B en muestras fecales líquidas, semisólidas y sólidas a niveles similares a los observados con la toxina A y la toxina B preparadas en el *Diluyente* del kit.

### REPRODUCIBILIDAD Y PRECISIÓN

Se enviaron cinco muestras fecales (una muestra negativa y cuatro muestras positivas) a cuatro laboratorios independientes para que fueran analizadas con la prueba C. *DIFFICILE TOX A/B TEST*. Todas las muestras permanecieron congeladas hasta la realización de la prueba. Los resultados de cada laboratorio se compararon con los resultados de los análisis internos y se comprobó que eran idénticos. En todos los centros se confirmó la positividad de las cuatro muestras positivas y la negatividad de la muestra negativa.

Se determinó el coeficiente de variación (CV) intraanalítico de la prueba C. *DIFFICILE TOX A/B TEST* analizando 32 reacciones de control positivas y 32 reacciones de control negativas junto con 8 muestras fecales negativas. Cada muestra fecal se analizó en 11 pocillos. El porcentaje del CV intraanalítico fue de 7,190 con el control positivo, de 6,557 con el control negativo y de 9,697 con las muestras fecales. Se determinó el CV interanalítico utilizando cuatro muestras fecales positivas y una negativa, evaluadas a las 0, 24, 48 y 72 horas. El porcentaje del CV osciló entre 9,9 y 29,6, con una media de 16,3.

## C. DIFFICILE TOX A/B II™ - DEUTSCH

### VERWENDUNGSZWECK

Der *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ Test ist ein Enzymimmunoassay für den Nachweis von Toxin A und B aus toxischen *Clostridium difficile*-Stämmen. Er dient dem Nachweis von Toxin A und B in Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf eine *C. difficile*-assoziierte Erkrankung. Der Test dient als Hilfsmittel bei der Diagnose einer *C. difficile*-assoziierten Erkrankung. Seine Ergebnisse sind im Zusammenhang mit der Patientenanamnese zu betrachten.

FÜR DIE *IN-VITRO*-DIAGNOSE.

### ERKLÄRUNG

Nach einer Antibiose treten bei vielen Patienten Magen-Darm-Beschwerden auf, die von leichtem Durchfall bis zu schwerer pseudomembranöser Kolitis reichen. Viele der leichteren Magen-Darm-Erkrankungen sowie die meisten Fälle von pseudomembranöser Kolitis werden von *Clostridium difficile* verursacht (1). Dieser Organismus ist ein opportunistisches anaerobes Bakterium, das sich im Darm ansiedelt, sobald die normale Darmflora durch das Antibiotikum verändert wird. Die Erkrankung ist auf die Toxine zurückzuführen, die der Organismus bildet. Man geht davon aus, dass die mit der Erkrankung assoziierten klinischen Symptome hauptsächlich von Toxin A verursacht werden, einem gewebescheidigenden Enterotoxin (2, 3). *Clostridium difficile* bildet noch ein zweites Toxin, das so genannte Toxin B. Toxin B, als Zytotoxin des Organismus bezeichnet, ist jenes Toxin, das durch den in vielen Labors eingesetzten Gewebekulturtest nachgewiesen wird. Die Stämme bilden entweder beide Toxine oder keines. Kürzlich wurden jedoch auch Toxin A-negative/Toxin B-positive Stämme identifiziert (4, 5). Diese Toxin A-negativen/Toxin B-positiven Stämme liefern beim *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ Test ein positives Ergebnis (6, 7).

*Clostridium difficile*-Stämme, die hohe Toxin-A-Konzentrationen bilden, bilden auch hohe Konzentrationen an Toxin B. Ebenso bilden Stämme, die geringe Konzentrationen an Toxin A bilden, auch geringe Toxin B-Konzentrationen. Dies weist darauf hin, dass die Toxinbildung möglicherweise ähnlich geregelt wird. Tests, die entweder eines der beiden oder beide Toxine nachweisen, werden als diagnostische Hilfsmittel eingesetzt. Die Gene für die Toxine wurden geklont und sequenziert. Einige Eigenschaften der Toxine sind nun eindeutig definiert (8, 9). Beide Toxine weisen eine hohe Molekülmasse auf ( $M_r$  Toxin A: 308.000;  $M_r$  Toxin B: 279.000). Toxin A weist eine Serie von sich wiederholenden Einheiten am COOH-Terminus des Moleküls auf, und diese sich wiederholenden Einheiten fungieren höchstwahrscheinlich als jener Bindungsteil, der die galaktosehaltigen Rezeptoren erkennt (10). Einige Fakten weisen darauf hin, dass Toxin A und B synergistisch wirken und die durch Toxin A verursachte anfängliche Gewebescheidung die Entfaltung der Toxizität von Toxin B ermöglicht. Aus diesem Grunde spielt trotz der Annahme, dass Toxin A den Großteil der klinischen Symptome verursacht, möglicherweise auch Toxin B eine wichtige Rolle bei der Erkrankung.

### TESTPRINZIP

Der *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ Test verwendet Antikörper gegen *Clostridium difficile* Toxin A und B. Die mit dem Kit mitgelieferten Mikrotiterplattenkavitäten enthalten einen immobilisierten affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper (Ziege) gegen Toxin A und B. Der Antikörper für den Nachweis besteht aus einer Mischung aus monoklonalem Toxin-A-Antikörper aus der Maus, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, und einem polyklonalen Toxin-B-Antikörper aus der Ziege, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Bei dem Test wird ein Aliquot einer Stuhlprobe im *Verdünnungspuffer* emulgiert und die verdünnte Probe in die Mikrotiterplattenkavität mit dem Nachweisantikörper übertragen. Sind Toxin A und B in der Probe vorhanden, so binden sie während der Inkubationsphase an den Nachweisantikörper und den immobilisierten polyklonalen Antikörper. Nicht gebundenes Material wird während der Waschschrirte entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wird aufgrund der Enzym-Antikörper-Antigen-Komplexe, die sich in Gegenwart von Toxin bilden, eine Färbung nachgewiesen.

**PACKUNGSIHALT****DIL** **SPE**

**Verdünnungspuffer**, 40 ml, gepufferte Proteinlösung +0,02% Thimerosal. Der *Verdünnungspuffer* wird auch als negative Kontrolllösung verwendet (siehe TESTVERFAHREN).

**CONJ** **ENZ**

**Konjugat**, 7 ml, Toxin A-spezifischer monoklonaler Antikörper aus der Maus, gebunden an Meerrettich-Peroxidase, und Toxin B-spezifischer polyklonaler Antikörper aus der Ziege, gebunden an Meerrettich-Peroxidase, in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal

**SUBS** **REAG**

**Substrat**, 14 ml, Lösung aus Tetramethylbenzidin und Peroxid

**CONTROL** **+**

**Positive Kontrolle**, 3,5 ml, inaktivierte Toxine in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal

**WASHBUF** **20X**

**Waschpuffer-Konzentrat**, 50 ml, 20x-Konzentrat mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung, Detergens und 0,2 % Thimerosal

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**, 0,6N

**Stopplösung**, 7 ml, 0,6 N Schwefelsäure. VORSICHT: Kontakt mit der Haut vermeiden; sofort mit Wasser spülen, wenn es zu Hautkontakt kommt.

**MA** **PLT**

**Mikrotiterplatte**, 12 Streifen mit je 8 Kavitäten, beschichtet mit Toxin-A- und Toxin-B-spezifischen affinitätsgereinigten Antikörpern aus der Ziege (mit Trockenmittel gelagert).

**Waschlösungsetikett**, 1 Etikett**Applikatorstäbchen**, 50 Stäbchen**ZUBEHÖR**

Einweg-Kunststoffpipetten, 100 Pipetten

Kunststoff-Klebebögen, 2 Bögen

**BENÖTIGTES, NICHT ENTHALTENES MATERIAL**

Waschflasche

Zeitmesser

Vortex-Schüttler

Abfallbehälter

Destilliertes Wasser Reagenzgläser zur Probenverdünnung

Papiertücher bzw. Saugpapier

Spektrophotometer für zwei Wellenlängen bei 450/620 nm oder eine Wellenlänge bei 450 nm (Plattenlesegerät für zwei Wellenlängen wird empfohlen; Absorptionen sollten bei 450 nm gemessen und bei 620 nm referenziert werden)

Kühlschrank, zwischen 2 °C und 8 °C eingestellt

Inkubator auf 37 °C ± 2 °C eingestellt

**HALTBARKEIT UND LAGERUNG**

Das Verfallsdatum des Testkits ist auf dem Packungsetikett angegeben. Das Verfallsdatum für die einzelnen Bestandteile ist auf den jeweiligen Etiketten angegeben. Das Kit mit den Reagenzien von bestimmter Haltbarkeit muss zwischen 2 °C und 8 °C gelagert und nach dem Gebrauch so schnell wie möglich wieder in den Kühlschrank gestellt werden.

**VORSICHTSMASSNAHMEN**

1. Reagenzien aus verschiedenen Kits nicht mischen. Verwenden Sie das Testkit nicht nach dem Verfallsdatum.
2. Die Reagenzien müssen vor dem Gebrauch Raumtemperatur annehmen.
3. Verschlüsse und Spitzen sind farbkodiert; nicht vertauschen!
4. Achten Sie bei der Handhabung der Kavitäten darauf, diese nicht zu verkratzen, da dies zu erhöhten Absorptionsmesswerten führen kann.
5. Halten Sie die Tropfflaschen senkrecht, um die richtige Tropfengröße sicherzustellen.
6. Behandeln Sie die Proben und gebrauchten Kavitäten als infektiöses Material. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Handschuhe.
7. Die Reagenzien enthalten 0,02% Thimerosal als Konservierungsmittel und sind gemäß üblicher Laborpraxis mit Vorsicht zu behandeln.
8. Die *Stopplösung* enthält 0,6 N Schwefelsäure. Bei Kontakt sofort mit Wasser abspülen.
9. *Nicht verwendete Kavitäten der Mikrotiterplatte müssen mit Trockenmittel zurück in den wiederverschließbaren Beutel gegeben werden, damit sie vor Feuchtigkeit geschützt sind.*
10. Führen Sie das Waschverfahren nach Anweisung durch, um starke Hintergrundreaktionen zu vermeiden.

11. Verwenden Sie Stuhlproben nach Entnahme innerhalb von 24 Stunden, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Gefrorene Proben (-20 °C oder darunter) können bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen an Aktivität verlieren.
12. Das *Substrat* ist lichtempfindlich und muss vor direktem Sonnenlicht und UV-Quellen geschützt werden.
13. Wenn das angegebene Testverfahren befolgt wird, werden optimale Ergebnisse erzielt. Die Konzentrationen, Inkubationsbedingungen und Verfahrensdetails wurden in Bezug auf Sensitivität und Spezifität optimiert. Abweichungen vom angegebenen Verfahren und/oder Änderungen der Testbedingungen können die Sensitivität und Spezifität des Tests beeinflussen.

## ENTNAHME UND HANDHABUNG DER STUHLPROBEN

**BITTE BEACHTEN:** Für die Entnahme und Handhabung von Stuhlproben sind die üblichen Labormethoden geeignet. **Die Proben müssen so rasch wie möglich transportiert und im Verdünnungspuffer des Kits verdünnt werden.** Die Proben müssen 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 72 Stunden nach der Entnahme durchgeführt werden kann (11). Das Einfrieren und Auftauen, besonders wenn es mehrfach erfolgt, führt zu einem Aktivitätsverlust aufgrund des Toxinverlusts. Es dürfen keine Stuhlproben verwendet werden, die in 10% Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol konserviert sind. Stellen Sie sicher, dass die Proben vor der Testdurchführung gründlich gemischt werden (Vortexen). Sowohl die Probe vor der Übertragung in den Verdünnungspuffer als auch die verdünnte Probe vor Durchführung des Tests müssen vollständig gemischt werden. Der Verdünnungspuffer wurde zur Stabilisierung der Toxine in Stuhlproben und Verfallsminimierung formuliert. Die mitgelieferten Einweg-Pipetten sind auf 50, 100, 200 und 300 µl geeicht. Stuhlproben können optional im STOOL-PREP™\* (Katalognr. T9015, siehe Gebrauchsanweisung) verdünnt und zwischen 2 °C und 8 °C gelagert werden.

1. Bereiten Sie für jede zu testende Probe ein Verdünnungsreagenzglas vor. Geben Sie 200 µl Verdünnungspuffer in jedes Reagenzglas. Beschriften Sie das Reagenzglas direkt auf der Seite.
2. Übertragen Sie  **feste Stuhlproben**  mithilfe eines Applikatorstäbchens in das Reagenzglas. Übertragen Sie eine Menge mit einem Durchmesser von ca. 3 mm mit dem Applikatorstäbchen in den **Verdünnungspuffer**. Bei **flüssigen Stuhlproben** übertragen Sie 50 µL Probe mithilfe einer Kunststoffpipette in das Reagenzglas. Stellen Sie sicher, dass die flüssigen Proben vor dem Übertragen gleichmäßig suspendiert werden.
3. Vortexen Sie die Reagenzgläser 10 Sekunden und lagern Sie diese bis zur Durchführung des ELISA zwischen 2 °C und 8 °C (innerhalb von 72 Stunden nach der Entnahme). Vortexen Sie erneut, bevor Sie die verdünnte Probe in die Mikrotiterplattenkavität übertragen. Damit ist eine gründliche Durchmischung der Probe gewährleistet.
4. Bei Proben, die zur Entfernung von Partikeln zentrifugiert wurden (5000 x g – 10 Minuten), können halbautomatische Waschgeräte verwendet werden.

## VORBEREITUNGEN

1. **WICHTIG:** Vor der Testverwendung müssen alle Reagenzien Raumtemperatur angenommen haben.
2. Bereiten Sie die einfach konzentrierte (1x) *Waschlösung* zu. Das *Waschpuffer-Konzentrat* wird als 20x-Konzentrat geliefert (*möglicherweise ist ein Präzipitat sichtbar*). Verdünnen Sie es auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter, indem Sie 50 ml Konzentrat 950 ml destilliertem Wasser hinzufügen. Beschriften Sie die Flasche. Lagern Sie nicht gebrauchte 1x-*Waschlösung* zwischen 2 °C und 8 °C.
3. **Vorbereitung der Teststreifen** Jeder Streifen enthält 8 Kavitäten, die mit Toxin-A- und Toxin-B-spezifischen affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpern beschichtet sind. Für jede Probe bzw. Kontrolle ist eine dieser beschichteten Kavitäten vorgesehen. Legen Sie die Anzahl der zu verwendenden Kavitäten fest. Vermeiden Sie eine

Berührung des Bodens der Kavitäten. Nicht verwendete Mikrotiterplattenkavitäten müssen zurück in den Kunststoffbeutel gegeben und mit Trockenmittel gut verschlossen werden.

### TESTVERFAHREN

1. Geben Sie einen Tropfen (50 µl) *Konjugat* (roter Verschluss) in jede Kavität. Achten Sie darauf, jede Flasche dabei senkrecht zu halten. Verwenden Sie 1 Kavität je Stuhlprobe, 1 Kavität für die positive Kontrolle und 1 Kavität für die negative Kontrolle (*Verdünnungspuffer*). Die Kavitäten können zur Identifizierung direkt auf der Seite beschriftet werden.
2. Übertragen Sie 100 µl (2 Tropfen mithilfe einer Transferpipette aus dem Zubehör-Set) der verdünnten Stuhlprobe in die Kavität; bei Verwendung eines *STOOL-PREP™\** geben Sie die verdünnte Stuhlprobe laut Gebrauchsanweisung für den *STOOL-PREP™\** hinzu. Geben Sie 1 Tropfen (50 µl) der *positiven Kontrolle* (schwarzer Verschluss) in die für die positive Kontrolle vorgesehene Kavität sowie 50 µl (1 Tropfen mithilfe einer Transferpipette aus dem Zubehör-Set) der *negativen Kontrolle* (*Verdünnungspuffer*) in die für die negative Kontrolle vorgesehene Kavität.
3. Schneiden Sie den Kunststoffklebebogen so zurecht, dass er die Kavitäten abdeckt. Decken Sie die Kavitäten ab, und inkubieren Sie sie bei 37 °C ± 2 °C für 50 Minuten.
4. Schütteln Sie den Inhalt der Mikrokavitäten in eine Abfallschale.
5. Waschen Sie jede Kavität mit der 1x-Waschlösung aus einer Spritzflasche mit feiner Düse, indem Sie die *Waschlösung* jeweils kraftvoll auf den Boden der Kavität richten. Füllen Sie die Vertiefungen, und schütteln Sie die *Waschlösung* aus der Vertiefung in eine Abfallschale aus. Schlagen Sie die umgedrehte Platte gegen ein trockenes Papiertuch, und wiederholen Sie Schritt 5 **vier Mal**, wobei Sie jedes Mal ein trockenes Papiertuch verwenden. Wenn in den Kavitäten Partikel sichtbar sind, fahren Sie mit dem Waschen fort, bis alle Partikel entfernt sind. **Bitte beachten:** Bei Verwendung automatischer oder halbautomatischer Waschgeräte müssen die Proben zur Entfernung von Partikeln zentrifugiert werden (5000 x g – 10 Minuten). Geben Sie 350 µl 1x-*Waschlösung* in jede Kavität. Insgesamt fünf Mal waschen. Bei Verwendung eines *STOOL-PREP™\** waschen Sie die Platte einmal mit der Hand und schlagen sie kräftig gegen trockene Papiertücher aus. Danach 4 Mal mit einem automatischen Waschgerät waschen (insgesamt 5 Waschvorgänge). Wenn in den Kavitäten Partikel sichtbar sind, fahren Sie mit dem Waschen fort, bis alle Partikel entfernt sind.
6. Entfernen Sie nach dem Waschen sämtliche Flüssigkeitsreste aus den Kavitäten, indem Sie die Platte nochmals gegen ein trockenes Papiertuch ausschlagen, bis keine Flüssigkeit mehr austritt. *Entsorgen Sie die Papiertücher und Probengefäße ordnungsgemäß.*
7. Geben Sie 2 Tropfen (100 µl) *Substrat* (blauer Verschluss) in jede Kavität. Klopfen Sie zum Mischen des Substrats sanft gegen die Kavitäten. Inkubieren Sie die Kavitäten 10 Minuten lang bei Zimmertemperatur. Klopfen Sie nach 5 Minuten sanft gegen die Kavitäten.
8. Geben Sie 1 Tropfen (50 µl) *Stopplösung* (gelber Verschluss) in jede Kavität. Klopfen Sie sanft gegen die Kavitäten und warten Sie bis zum Ablesen 2 Minuten. Durch Zugabe der *Stopplösung* wandelt sich die blaue Färbung in eine gelbe Färbung um. Dieser Effekt kann quantifiziert werden, indem die optische Dichte bei 450 nm mit einem ELISA-Lesegerät gemessen wird. Für das Instrument muss der Leerwert gegen Luft ermittelt werden. Wenn Sie ein Lesegerät für zwei Wellenlängen benutzen, messen Sie den Leerwert bei 620 nm und lesen bei 450 nm ab. Wischen Sie vor Messung der optischen Dichte die Unterseite jeder Kavität ab. Sollte kein ELISA-Lesegerät verfügbar sein, so kann das Testergebnis bei guten Lichtverhältnissen gegen einen weißen Hintergrund visuell abgelesen werden. Lesen Sie innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der *Stopplösung* ab.

### ALTERNATIVES TESTVERFAHREN/SCHNELLTEST

Führen Sie das reguläre Testverfahren gemäß o. g. Anleitung durch und ersetzen Sie dabei die Inkubationszeit von 50 Minuten bei 37 °C ± 2 °C durch 20 Minuten bei 37 °C.

Verwenden Sie dabei den *Stat Fax 2200 Inkubator/Schüttler* oder einen gleichwertigen Inkubator/Schüttler. Bei Verwendung des *Stat Fax 2200 Inkubators/Schüttlers* stellen Sie den Schüttler auf die Geschwindigkeitsstufe 7 und die Temperatur auf 37 °C. Bei Verwendung eines anderen Schüttlers wird eine Geschwindigkeit von 1500 Umdrehungen pro Minute (UpM) empfohlen. Beim Schüttelvorgang darf nichts verschüttet werden. Andernfalls Geschwindigkeit entsprechend reduzieren (11).

### QUALITÄTSKONTROLLE

1. Bei jeder Testprobenserie müssen eine positive und negative Kontrolle mitgetestet werden.
2. Die positive und negative Kontrolle müssen in ihrem jeweiligen Bereich liegen, andernfalls ist der Test ungültig.
  - a) Die positive Kontrolle muss eine sichtbare gelbe Färbung aufweisen. Wenn mit einem Spektrophotometer abgelesen wird, muss die optische Dichte bei 450 bzw. 450/620  $\geq 0,500$  sein.
  - b) Die negative Kontrolle muss visuell farblos sein. Wenn mit einem Spektrophotometer abgelesen wird, muss die optische Dichte bei 450  $< 0,120$  sein. Wenn bei 450/620 abgelesen wird, muss die Absorption  $< 0,080$  sein.
3. Kavitäten, die visuell farblos sind, jedoch eine Absorption  $\geq 0,120$  liefern, müssen auf der Unterseite abgewischt und nochmals gemessen werden.
4. Visuelles Ablesen muss bei gutem Licht gegen einen weißen Hintergrund durchgeführt werden.
5. Wenn eine Probe, die neben einer stark positiven liegt, ein schwach positives Ergebnis (d. h. OD  $< 0,200$ ) liefert, so muss diese erneut getestet werden, um eine mögliche Verschleppung ausschließen zu können.

### INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

#### 1. Visueller Messwert

Negativ = Farblos

Positiv = gelbe Färbung

#### 2. Spektrophotometrie bei einer Wellenlänge von 450 nm

Negativ = OD  $< 0,120$

Positiv = OD  $\geq 0,120$

#### 3. Spektrophotometrie bei zwei Wellenlängen von 450/620 nm

Negativ = OD  $< 0,080$

Positiv = OD  $\geq 0,080$

Ein positives Testergebnis weist darauf hin, dass *C. difficile* Toxin A und/oder Toxin B in der Stuhlprobe vorhanden sind.

### GRENZEN DES *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ TESTS

1. Der *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ Test dient zum Nachweis von *C. difficile*-Toxin in Stuhlproben. Der Test bestätigt das Vorhandensein von Toxin im Stuhl. Diese Information muss vom Arzt unter Berücksichtigung der Patientenanamnese interpretiert werden. Kann kein Toxin A bzw. B in den Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf eine *C. difficile*-Erkrankung nachgewiesen werden, so schließt dies eine Erkrankung nicht aus, sondern ist möglicherweise auf andere Faktoren zurückzuführen (z. B. Fehler bei der Entnahme, Handhabung und/oder Lagerung der Proben, Toxinwerte unter der Nachweisgrenze des Kits). Der *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ Test weist Toxin A bei Konzentrationen von  $\geq 0,8$  ng/ml und Toxin B bei Konzentrationen von  $\geq 2,5$  ng/ml nach.
2. Stuhlproben sind überaus komplex. Optimale Ergebnisse werden beim *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ Test mit Proben erzielt, die weniger als 24 Stunden alt sind. Die meisten Proben können zwischen 2 °C und 8 °C für 72 Stunden gelagert werden, bevor ein deutlicher Zerfall des Toxins beobachtet wird. Wenn die Proben nicht innerhalb dieses Zeitraums getestet werden, können sie eingefroren und später wieder aufgetaut werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen kann jedoch zu einem Aktivitätsverlust der Proben aufgrund des Toxinverfalls führen.



3. Einige Proben können schwach reagieren. Dies kann auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden, wie etwa das Vorhandensein eines schwach toxischen Stammes, geringe Toxinbildung *in vivo*, das Vorhandensein bindender Substanzen oder inaktivierender Enzyme im Stuhl. *Unter diesen Bedingungen sollte der Test der Stuhlprobe wiederholt oder eine neue Stuhlprobe getestet werden.* Zusätzliche Tests, die gemeinsam mit dem *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ Test durchgeführt werden können, sind Isolierung des Organismus auf selektiven Medien, Latex-Agglutination für den Nachweis von *C. difficile* (Organismus) oder Gewebekultur-Zytotoxizitätstests für den Nachweis von *C. difficile*-Toxin. Die Isolierung des Organismus allein lässt nicht auf Toxin schließen. Dies muss durch zusätzliches Testen des Isolats mit einem ELISA oder Gewebekulturtest bestätigt werden, um eine Toxigenität zu beweisen. Ebenso liefert der Latex-Agglutinationstest, der ein nicht-toxisches Protein von *C. difficile* nachweist, keinen Beweis für das Vorhandensein von toxischem *C. difficile*.
4. Bestimmte toxische Isolate von *Clostridium sordellii* bilden Toxine, die den *C. difficile*-Toxinen in ihren biologischen, physikochemischen und immunologischen Eigenschaften sehr ähnlich sind. Diese Isolate wurden nicht bei Patienten mit Antibiotika-assoziiierter Diarrhöe und Kolitis nachgewiesen.
5. Stuhlproben, die in 10% Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol konserviert wurden, dürfen nicht verwendet werden.
6. Die Leistungsdaten des *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ Tests wurden nicht vollständig für die pädiatrische Population bestimmt.

## ERWARTUNGSWERTE

Die Prävalenz eines positiven *C. DIFFICILE TOX A/B TESTS* gemeinsam mit einer positiven Gewebekultur und/oder toxischen Kultur betrug in einer Studie 5,4 % und in einer weiteren Studie 8,6 %. Die Prävalenz ist von Ort zu Ort unterschiedlich. Krankenhäuser können auch niedrigere oder höhere Raten als jene an den Standorten zur Beurteilung des *C. DIFFICILE TOX A/B TESTS* festgestellten 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 (Toxin-positiv bei Gewebekultur oder ELISA) auf. Zudem wurde bei Mukoviszidose-Patienten eine *C. difficile*-Trägerrate von 22-32 % festgestellt (12-14).

## LEISTUNGSDATEN

### Klinische Beurteilung

Der *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* wurde mit dem Gewebekulturtest in vier Krankenhäusern in den USA sowie intern bei TECHLAB®, Inc verglichen. Die dabei untersuchten Proben wurden für Routinetests in das klinische Labor eingesandt. Der Gewebekulturtest wurde nach dem internen Verfahren durchgeführt. Tabelle 1. zeigt einen Vergleich des *C. DIFFICILE TOX A/B TESTS* mit einem Gewebekulturtest. Von den 1.152 untersuchten Proben stammten ca. 3,6 % von Kindern im Alter von bis zu 2 Jahren. Es lagen keine Proben mit einem positiven Ergebnis beim *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* und einem negativen Ergebnis beim Gewebekulturtest vor. Die Gesamtsensitivität des *C. DIFFICILE TOX A/B TESTS* lag zwischen 83,3 % und 96 % (Konfidenzintervall von 87,4 bis 95,0,  $p=0,05$ ) Die Spezifität betrug bei allen Studien 100 %. Der positive Vorhersagewert betrug bei allen Studien 100 % und der negative Vorhersagewert lag zwischen 90 % und 99,5 % (Konfidenzintervall von 93,8 bis 99,8,  $p=0,05$ ). Die Korrelation lag zwischen 94,9 % und 99,5 % (Konfidenzintervall von 96,6 bis 99,4,  $p=0,05$ ).



**TABELLE 1** Korrelation des *C. DIFFICILE TOX A/B TESTS* mit einem Gewebekulturtest (n=1,152).

	Gewebekultur positiv	Gewebekultur negativ
<i>C. DIFFICILE TOX A/B TEST</i> positiv	165	0
<i>C. DIFFICILE TOX A/B TEST</i> negativ	14	973
Sensitivität	92,2 %	
Spezifität	100%	
Korrelation	98,8 %	
Positiver Vorhersagewert	100%	
Negativer Vorhersagewert	98,6 %	

### Interner Vergleich

Im Rahmen einer internen Studie wurde der *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ Test mit dem *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* verglichen. Bei der Studie wurden 218 klinische Proben untersucht, die für *C. difficile*-Routinetests in das klinische Labor eingesandt wurden. Die Ergebnisse aus den beiden Tests waren vergleichbar.

### Zentrifugation

Insgesamt wurden 337 Stuhlproben (30 positive und 307 negative) zur Bestimmung der Zentrifugationswirkung auf die Testergebnisse evaluiert. Für die Analyse wurden die Proben laut Packungsbeilage verdünnt und gevortext. Die Proben wurden zentrifugiert (5000 x g), um unlösliches Material zu entfernen, und die Überstandsflüssigkeit wurde mit dem *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* getestet. Die Ergebnisse wurden mit jenen verglichen, die mit demselben Panel an verdünnten und gevortexten Proben ohne Zentrifugation erzielt wurden. Die Ergebnisse zeigten eine 100%ige Korrelation zwischen zentrifugierten und nicht zentrifugierten Proben.

### KREUZREAKTIVITÄT

Verschiedene Organismen wurden mit dem *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* auf Kreuzreaktivität untersucht. Für die Analyse wurden mit Verdünnungspuffer vermischte Bouillonkulturen evaluiert. Es wurden Bouillonkulturen in der Protokollphase mit >10<sup>8</sup> Bakterien/ml verwendet. Die Organismen, die unter keinen Bedingungen reagierten, sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die einzigen Organismen, die reagierten, waren toxische *C. difficile* und ein toxischer *C. sordellii*-Stamm (VPI 9048), der Toxine bildet, welche eine signifikante Kreuzreaktivität mit *C. difficile*-Toxinen aufweist. Ein nicht toxischer *C. sordellii*-Stamm, der kein hämorrhagisches Toxin (HT) bildet, lieferte ein negatives Testergebnis. *C. sordellii* wird nicht mit pseudomembranöser Kolitis oder Antibiotika-assoziiierter Diarrhöe in Verbindung gebracht. Unter den analysierten toxischen *C. Difficile*-Stämmen befanden sich 6 schwach bis stark toxische Stämme sowie 2 nicht toxische Stämme. Der *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* wies alle 6 toxischen Stämme nach und zeigte keine Reaktion mit den beiden nicht toxischen Stämmen.

**TABELLE 2** Organismen, die nicht im *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* reagierten

<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Clostridium novyi</i> (Types A, B, C)	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i> (Types A-E)	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacteroides fragilis</i> (toxigenic/nontoxigenic)	<i>Clostridium sordellii</i> (nontoxigenic)	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Clostridium spiroforme</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Protein A-negative)
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Clostridium tetani</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Protein A-positive @ <10 <sup>9</sup> )
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium botulinum</i> (Types A-G)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Escherichia coli</i> (enterohemorrhagic)	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Clostridium difficile</i> (nontoxigenic)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	
	<i>Proteus vulgaris</i>	

### AUSWIRKUNGEN DER STUHLPROBENKONSISTENZ

Die Reaktionen der Stuhlproben unterschiedlicher Konsistenz im *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Rate an positiven Reaktionen war bei allen drei Stuhlprobentypen ähnlich. Alle Proben wurden zum Testen auf *C. difficile* eingesandt. Ob eine Probe getestet wird oder nicht, hängt von der Krankengeschichte des Patienten und nicht von der Probenkonsistenz ab. In weiteren Studien wurden flüssige, halb feste und feste Stuhlproben mit hochreinem Toxin A und Toxin B versetzt.

TABELLE 3 Auswirkung der Probenkonsistenz

Test	Flüssige Proben	Halbfeste Proben	Feste Proben
Anzahl der Proben (n = 435)	150	133	152
<i>C. DIFFICILE TOX A/B TEST</i> positiv	13 (8,7 %)	11 (8,3 %)	13 (8,6 %)
Gewebekultur positiv	13 (8,7 %)	14 (10,5 %)	15 (9,9 %)

Der *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* wies Toxin A und B in flüssigen, halb festen und festen Stuhlproben in ähnlichen Konzentrationen wie jene nach, die bei in *Verdünnungspuffer* zubereitetem Toxin A und Toxin B beobachtet wurden.

### REPRODUZIERBARKEIT UND PRÄZISION

5 Stuhlproben (1 negative und 4 positive) wurden in vier unabhängige Labors zur Analyse mit dem *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* eingesandt. Alle Proben wurden bis zur Durchführung des Tests eingefroren. Die Ergebnisse der einzelnen Labors wurden mit internen Ergebnissen verglichen und für identisch befunden. An jedem Standort wurden die 4 positiven Proben als positiv und die negative Probe als negativ bestätigt.

Der Intra-Assay-Variationskoeffizient (VK) für den *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* wurde durch Analyse der Reaktion von 32 positiven und 32 negativen Kontrollen gemeinsam mit 8 negativen Stuhlproben bestimmt. Jede Stuhlprobe wurde in 11 Kavitäten getestet. Der Intra-Assay-VK betrug für die positive Kontrolle 7,190 %, für die negative Kontrolle 6,557 % und 9,697 % für die Stuhlproben. Der Inter-Assay-VK wurde mit 4 positiven und 1 negativen Stuhlprobe bestimmt, die nach 0, 24, 48 und 72 Stunden getestet wurden. Der VK lag zwischen 9,9 % und 29,6 % mit einem Mittelwert von 16,3 %.

## C. DIFFICILE TOX A/B II™ - FRANÇAIS

### UTILISATION PRÉVUE

Le test *C. DIFFICILE TOX A/B II™* est une analyse immuno-enzymatique pour le dépistage des toxines A et B produites par des souches toxigènes de *Clostridium difficile*. Il peut être utilisé pour dépister des toxines A et B dans des échantillons de selles chez des personnes susceptibles de souffrir de la maladie *C. difficile*. Le test permet de diagnostiquer la maladie du *C. difficile* ; les résultats obtenus doivent néanmoins être évalués en association avec le dossier médical du patient.

POUR UNE UTILISATION DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

### EXPLICATION

Après un traitement antibiotique, de nombreux patients développent des problèmes gastro-intestinaux pouvant aller d'une légère diarrhée à des colites pseudomembraneuses. De nombreuses formes légères de maladies gastro-intestinales et la plupart des cas de colites pseudomembraneuses sont provoqués par le *Clostridium difficile* (1). Cet organisme est une bactérie anaérobie à germes opportunistes qui se développe dans l'intestin dès la modification de la flore normale par l'antibiotique. La maladie est le résultat des toxines produites par l'organisme. Les symptômes cliniques associés à la maladie sont d'abord considérés comme étant dus à la toxine A, une entérotoxine qui endommage les tissus (2,3). Le *Clostridium difficile* produit également une deuxième toxine appelée toxine B. Cette dernière, qui est considérée comme la cytotoxine de l'organisme, est détectée lors de l'essai par culture tissulaire actuellement utilisé dans de nombreux laboratoires. La plupart des souches produisent les deux toxines ou aucune d'entre elles, bien que des souches positives à la toxine B et négatives à la toxine A aient été récemment identifiées (4,5). Ces souches de toxines A négatives/B positives sont positives au test *C. DIFFICILE TOX A/B II™* (6,7).

Les souches de *Clostridium difficile* qui produisent des niveaux élevés de toxine A produisent également des niveaux élevés de toxine B. De la même façon, les souches produisant de faibles niveaux de toxine A produisent également de faibles niveaux de toxine B, ce qui indique que la production des toxines peut être régulée de manière semblable. Les tests qui dépistent l'une des toxines ou les deux sont utilisés comme outil diagnostique. Les gènes des toxines ont été copiés et classés de sorte que certaines de leurs propriétés sont maintenant bien définies (8,9). D'un poids moléculaire de 308 000 et 279 000 respectivement, les toxines A et B sont de grosses toxines. La toxine A présente une série complexe d'unités répétitives au niveau du COOH (acide carboxylique) terminal de la molécule, ces unités répétitives pouvant servir de partie d'attachement identifiant les récepteurs contenant du galactose (10). Certains indices suggèrent que les toxines A et B agissent en synergie et que les lésions tissulaires initiales dues à la toxine A permettent à la toxine B d'exercer sa toxicité. Par conséquent, bien que la toxine A soit tenue pour responsable de la plupart des symptômes cliniques, la toxine B peut également jouer un rôle important dans la maladie.

### PRINCIPE DU TEST

Le *C. DIFFICILE TOX A/B II™* utilise des anticorps aux toxines A et B de *Clostridium difficile*. Les micropuits fournis dans le kit contiennent des antigènes polyclonaux de chèvre purifiés contre les toxines A et B. L'anticorps de dépistage est composé d'un mélange d'anticorps monoclonaux de souris spécifiques à la toxine A conjugués à la peroxydase de raifort et à des anticorps de chèvre polyclonaux spécifiques à la toxine B conjugués à la peroxydase de raifort. Lors de l'essai, une aliquote d'un échantillon de selles est émulsifiée dans le *Diluant* et l'échantillon dilué est transféré dans le micropuits contenant l'anticorps de dépistage. Si des toxines A et B sont présentes dans l'échantillon, elles seront liées à l'anticorps de dépistage et aux anticorps polyclonaux immobilisés pendant la phase d'incubation. Toute substance non liée est éliminée lors du processus de lavage. L'adjonction du substrat entraîne une modification de la coloration suite à la formation de complexes enzyme-anticorps-antigène en présence de toxines.

**MATÉRIEL FOURNI**

**DIL | SPE** **Diluant**, 40 ml, solution de protéine tamponnée contenant + 0,02 % de thimérosal. Le *Diluant* est également utilisé comme solution de contrôle Négatif (voir PROCÉDURE DE TEST).

**CONJ | ENZ** **Conjugué**, 7 ml - Anticorps monoclonal de souris spécifique à la toxine A conjugué à la peroxydase de raifort et anticorps polyclonal de chèvre spécifique à la toxine B conjugué à la peroxydase de raifort dans une solution de protéine tamponnée contenant + 0,02 % de thimérosal.

**SUBS | REAG** **Substrat**, 14 ml (solution contenant du tétraméthylbenzidine et du peroxyde).

**CONTROL | +** **Contrôle Positif**, 3,5 ml, toxines inactivées dans une solution de protéine tamponnée contenant du thimérosal à 0,02 %.

**WASHBUF | 20X** **Tampon de lavage concentré**, 50 ml, concentré à 20X contenant un tampon salin phosphaté, un détergent et 0,2 % de thimérosal.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> | 0.6N** **Solution d'arrêt**, 7 ml, 0,6 N d'acide sulfurique. ATTENTION : Éviter tout contact avec la peau ; en cas de contact, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau.

**MA | PLT** **Microplaques**, 12 bandes, 8 micropuits par bande enduits d'anticorps de chèvre purifiés spécifiques aux toxines A et B (conservé avec un produit dessiccant)

**Étiquette de solution de lavage**, 1 étiquette

**Écouvillons**, 50 bâtonnets

**ACCESSOIRES**

*Pipettes en plastique jetables*, 100

*Films adhésifs plastiques*, 2

**MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS**

*Pissette*

*Minuterie*

*Agitateur vortex*

*Réceptacle à déchets*

*Eau distillée*

*Tubes de dilution de l'échantillon*

*Serviettes en papier ou feuilles absorbantes*

Un *spectrophotomètre* capable de lire une onde double à 450/620 nm ou une onde simple à 450 nm (un lecteur de plaque à onde double est recommandé ; les absorbances doivent être mesurées à 450 nm et référencées à 620 nm).

*Réfrigérateur* entre 2° et 8°C *Incubateur* à 37°C ± 2°C

**DURÉE DE CONSERVATION ET STOCKAGE**

La date d'expiration du kit est indiquée sur l'étiquette. La date d'expiration de chaque composant est indiquée sur chaque étiquette. Le kit contenant les réactifs dont la durée de conservation est indiquée doit être conservé à une température comprise entre 2° et 8°C et remis au réfrigérateur aussitôt que possible après utilisation.

**PRÉCAUTIONS À PRENDRE**

1. Les réactifs des différents kits ne doivent pas être mélangés. Ne pas utiliser de kit dont la date d'expiration serait dépassée.
2. Les réactifs doivent être à température ambiante avant utilisation.
3. Les capsules et les embouts sont classés par couleur. Ne pas les mélanger !
4. Lors des manipulations, éviter d'érafler le fond des micropuits, toute dégradation pouvant entraîner une lecture élevée de l'absorbance.
5. Tenir les compte-gouttes en position verticale de façon à dispenser des gouttes de taille adéquate.
6. Manipuler les échantillons et micropuits utilisés comme tout facteur potentiel de transmission d'agents infectieux. Utiliser des gants pour effectuer les tests.
7. Les réactifs contiennent du thimérosal à 0,02 % qui est utilisé en tant que conservateur. Ils doivent donc être manipulés conformément aux consignes données par les laboratoires.
8. La *Solution d'arrêt* contient 0,6 N d'acide sulfurique. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau.
9. *Les micropuits non utilisés doivent être placés dans l'emballage refermable contenant un agent de dessiccation pour les protéger de l'humidité.*

10. Le lavage doit être réalisé suivant les consignes indiquées afin d'éviter toute réaction hors essai.
11. 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 ou moins) peuvent perdre de leur activité suite à la congélation et à la décongélation.
12. Le *Substrat* est photosensible et ne doit pas être directement exposé à la lumière solaire ou à une source de rayons UV.
13. Les meilleurs résultats sont obtenus si la procédure de test spécifiée est respectée. Les concentrations, les conditions d'incubation et les spécifications de traitement ont été optimisées de façon à rendre le test sensible et spécifique. Toute modification de la procédure spécifiée et/ou des conditions de test peut altérer la sensibilité et la spécificité du test.

## PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

**REMARQUE :** *Les procédures standard utilisées sur place pour le prélèvement et la manipulation des échantillons de selles sont appropriées. Les échantillons doivent être transportés et dilués dans le Diluant du kit dès que possible. Les échantillons doivent être conservés à une température comprise entre 2° et 8°C. Si possible, tester les échantillons de moins de 24 heures. Conserver les échantillons à -20°C ou moins si le test ne peut être réalisé dans un délai de 72 heures après le prélèvement (11). La congélation et la décongélation de l'échantillon, en particulier si elles sont répétées, peuvent entraîner une perte d'activité due à la dégradation des toxines. Les échantillons fécaux conservés dans 10 % de formol, de formol thimérosal, de formol d'acétate de sodium ou d'alcool polyvinylique ne peuvent pas être utilisés. Veiller à ce que les échantillons soient bien mélangés (mixés) avant de réaliser l'essai. Ceci inclut le mélange complet de l'échantillon avant le transfert dans le Diluant ainsi que le mélange complet de l'échantillon dilué avant le transfert dans le micropuits. Le Diluant a été formulé pour stabiliser les toxines dans les échantillons de selles et pour réduire la dégradation. Les pipettes jetables fournies avec les accessoires sont graduées de 50, 100, 200 et 300 µL. Les échantillons peuvent être dilués dans le dispositif STOOL-PREP™\* en option (Cat.#T9015, voir les instructions d'utilisation) et conservés à une température comprise entre 2° et 8°C.*

1. Préparer un tube de dilution pour chaque échantillon à tester. Ajouter 200 µL de *Diluant* dans chaque tube. Apposer une étiquette sur le côté de chaque tube.
2. Pour les **échantillons de selles formés**, utiliser un écouvillon pour transférer l'échantillon de selles dans le tube. Transférer une quantité de 3 mm de diamètre environ avec l'écouvillon dans le *Diluant*. Pour les **échantillons de selles liquides**, utiliser une pipette en plastique pour transférer un échantillon de 50 µL dans le tube. Vérifier que les échantillons liquides sont parfaitement suspendus avant transfert.
3. Agiter les tubes pendant 10 secondes et les conserver à une température comprise entre 2° et 8°C jusqu'à réalisation du test ELISA (dans les 72 heures qui suivent le prélèvement). Agiter une fois de plus avant de transférer l'échantillon dilué vers le micropuits. Cette opération garantit un bon mélange de l'échantillon.
4. Un équipement de lavage semi-automatique peut être utilisé avec des échantillons centrifugés (5 000 x g pendant 10 minutes) pour retirer les particules.

## PRÉPARATIONS PRÉLIMINAIRES

1. **IMPORTANT :** Tous les réactifs doivent se trouver à température ambiante avant application dans l'essai.
2. Préparer la *Solution de lavage* à 1X. Le *Tampon de lavage* est fourni sous forme de concentré à 20X (*un précipité peut être observé*). Verser 50 ml de concentré dans 950 ml d'eau distillée pour obtenir un volume total d'un litre. Étiqueter la bouteille. Conserver toute *Solution de lavage* 1X non utilisée à une température comprise entre 2° et 8°C.
3. **Préparation de la bande d'essai** Chaque bande contient 8 micropuits enduits d'anticorps polyclonaux purifiés spécifiques aux toxines A et B. Chaque échantillon ou contrôle utilisera l'un de ces puits enduits. Déterminer le nombre de micropuits à utiliser. Éviter tout contact avec la base des puits. Les puits inutilisés doivent être remis dans le

sachet en plastique et ce dernier doit être fermé hermétiquement avec l'agent de dessiccation.

## PROCÉDURE DE TEST

1. Ajouter une goutte (50 µL) de *Conjugué* (bouchon rouge) dans chaque micropuits. Veiller à maintenir chaque flacon à la verticale lors de l'ajout des gouttes. Utiliser 1 puits pour chaque échantillon de selles, 1 puits pour le *Contrôle positif* et 1 puits pour le contrôle négatif (*c'est-à-dire le Diluant*). Les marques d'identification peuvent être écrites directement sur le côté du micropuits.
2. Transférer 100 µL (2 gouttes avec une pipette de transfert du kit d'accessoires) d'échantillon dilué dans les micropuits ; ou avec un dispositif *STOOL-PREP™\**, ajouter l'échantillon dilué en suivant les instructions relatives au *STOOL-PREP™\**. Ajouter 1 goutte (50 µL) du *Contrôle Positif* (bouchon noir) dans les puits de contrôle positif et 50 µL (1 goutte avec une pipette de transfert du kit d'accessoires) du contrôle négatif (*un Diluant par exemple*) dans les puits de contrôle négatif.
3. Couper le film adhésif plastique à la taille nécessaire pour couvrir les puits. Couvrir les puits et les laisser incuber à 37°C ± 2°C pendant 50 minutes.
4. Agiter le contenu hors des micropuits dans un réceptacle à déchets.
5. Nettoyer les micropuits en projetant énergiquement une *Solution de lavage* à 1X à l'aide d'un pulvérisateur à jet continu vers le fond de chaque micropuits. Remplir les puits puis agiter la *Solution de lavage* hors du puits dans un réceptacle à déchets. Rabattre la plaque à l'envers sur une serviette en papier sèche et répéter **quatre fois** l'étape 5 en utilisant une serviette en papier sèche à chaque fois. Si des particules sont visibles dans les micropuits, continuer le lavage jusqu'à disparition complète de ces dernières.  
**Remarque** : Avec un équipement de lavage semi-automatique ou automatique, les échantillons doivent être centrifugés (5 000 x g pendant 10 minutes) pour retirer les particules. Ajouter 350 µL de 1X *Solution de lavage* dans chaque micropuits. Laver 5 fois. Avec des dispositifs *STOOL-PREP™\** en option, laver la plaque une fois à la main, en la frappant fortement sur des serviettes en papier sèches et poursuivre avec 4 lavages dans un machine automatique, soit un total de 5 lavages. Si des particules sont visibles dans les micropuits, continuer le lavage jusqu'à disparition complète de ces dernières.
6. Après lavage, éliminer complètement tout liquide résiduel des micropuits en rabattant à nouveau énergiquement la plaque sur une serviette en papier sèche de façon à expulser toute trace de liquide. *Éliminer les serviettes en papier et les récipients ayant contenu des échantillons de façon appropriée.*
7. Verser 2 gouttes (100 µl) de *Substrat* (bouchon bleu) dans chaque micropuits. Tapoter légèrement les micropuits pour mélanger le substrat. Laisser incuber les micropuits à température ambiante pendant 10 minutes. Tapoter doucement les puits au bout de 5 minutes.
8. Verser 1 goutte (50 µl) de *Solution d'arrêt* (bouchon jaune) dans chaque micropuits. Tapoter légèrement les micropuits et attendre 2 minutes avant d'effectuer la lecture. Lors de l'adjonction de *Solution d'arrêt*, la couleur bleue vire au jaune. Cette modification peut être quantifiée en mesurant la densité optique à 450 nm sur un lecteur de microplaques ELISA. Le zéro d'absorbance de l'instrument doit être ajusté à l'air. Pour les lecteurs à double longueur d'onde, ajuster le zéro à l'air à 620 nm et effectuer le relevé à 450 nm. Essuyer le dessous de chaque micropuits avant de mesurer la densité optique. Si aucun lecteur ELISA n'est disponible, le test peut être lu à l'œil nu avec un bon éclairage sur fond blanc. Effectuer la lecture dans les dix minutes qui suivent l'adjonction de *Solution d'arrêt*.

## PROCÉDURE DE TEST ALTERNATIVE/FORMAT RAPIDE

Lancer la procédure de test régulière en suivant les instructions fournies ci-dessus, en remplaçant l'incubation de 50 minutes à 37°C ± 2°C par une incubation de 20 minutes à 37°C avec l'Incubateur/Agitateur *Stat Fax 2200* ou tout autre appareil équivalent. Si l'Incubateur/Agitateur *Stat Fax 2200* est utilisé, régler l'agitateur sur la vitesse 7 et la température sur 37° C. Si d'autres agitateurs sont utilisés, une vitesse de 1 500 t/min est recommandée.



Toute agitation peut provoquer des renversements. En cas de renversement, réduire la vitesse en conséquence (11).

## CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

1. Des contrôles positifs et négatifs doivent être effectués sur chaque série d'analyses d'échantillons.
2. Les contrôles positifs et négatifs doivent figurer dans les plages respectives ou le test est invalide.
  - a) Le contrôle positif doit être de couleur jaune. Lue sur un spectrophotomètre, la DO à 450 nm ou avec une onde double à 450/620 nm doit être  $\geq 0,500$ .
  - b) Le contrôle négatif doit être visuellement clair. Lue sur un spectrophotomètre, la DO à 450 nm doit être  $< 0,120$ . Lue à 450/620 nm, l'absorbance doit être  $< 0,080$ .
3. Les micropuits visuellement clairs mais indiquant une absorbance  $\geq 0,120$  doivent être essuyés dessous et remesurés.
4. Les relevés visuels doivent être pris dans de bonnes conditions d'éclairage sur fond blanc.
5. Un échantillon donnant un résultat positif faible ( $< 0,200$ ) et adjacent à un puits positif net doit être renouvelé pour garantir l'absence de contamination.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

### 1. Relevé visuel

Négatif = Incolore

Positif = De couleur jaune

### 2. Longueur d'onde spectrophotométrique simple à 450 nm

Négatif = DO  $< 0,120$

Positif = DO  $\geq 0,120$

### 3. Longueur d'onde spectrophotométrique double à 450/620 nm

Négatif = DO  $< 0,080$

Positif = DO  $\geq 0,080$

Un test positif indique la présence de toxine A et/ou de toxine B C. *difficile* dans l'échantillon de selles.

## LIMITES DU TEST C. DIFFICILE TOX A/B II™

1. Le test C. *DIFFICILE TOX A/B II™* est utilisé pour détecter la toxine du C. *difficile* dans les échantillons de selles. Le test confirme la présence de toxines dans les selles et ces informations doivent être examinées par le médecin avec le dossier médical du patient. L'impossibilité de détecter la toxine A ou B dans des échantillons de selles chez des patients susceptibles d'être atteints de la maladie C. *difficile* peut écarter une maladie réelle mais cela peut être dû à d'autres facteurs (prélèvement incorrect de l'échantillon, manipulation et/ou stockage incorrects, niveaux de toxine inférieurs aux limites de détection du kit). Le test C. *DIFFICILE TOX A/B II™* dépistera la toxine A à des niveaux  $\geq 0,8$  ng/ml et la toxine B à des niveaux  $\geq 2,5$  ng/ml.
2. Les échantillons de selles représentent un échantillon clinique extrêmement complexe. Le test C. *DIFFICILE TOX A/B II™* permet d'obtenir des résultats optimaux si les échantillons ont été prélevés moins de 24 heures à l'avance. La plupart des échantillons peuvent être stockés à une température comprise entre 2°C et 8°C pendant 72 heures avant qu'une dégradation significative de la toxine ne puisse être observée. Si les échantillons ne sont pas testés pendant cette période, ils peuvent être congelés puis décongelés. La congélation et la décongélation de l'échantillon, en particulier si elles sont répétées, peuvent entraîner la perte d'activité des échantillons suite à une dégradation de la toxine.
3. Certains échantillons peuvent entraîner des réactions faibles. Ce phénomène peut découler d'un certain nombre de facteurs tels que la présence de souches faiblement toxinogènes, de faibles niveaux de toxines *in vivo* ou encore de la présence de substances anticorps ou de la désactivation des enzymes dans les selles. *Le cas échéant, un nouveau test doit être effectué sur le même échantillon ou sur un échantillon frais.* Des tests supplémentaires peuvent être réalisés en association avec



le test *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ Ils comprennent notamment l'isolement de l'organisme dans un milieu sélectif, l'essai d'agglutinement de latex permettant de détecter le *C. difficile* (l'organisme) ou des essais de cytotoxicité par culture tissulaire pour dépister la toxine *C. difficile*. L'isolement de l'organisme ne permet pas de confirmer qu'il est toxigène. Cela doit être confirmé par d'autres tests de l'isolat avec l'ELISA ou l'essai par culture tissulaire pour démontrer la toxigénicité. De la même façon, l'essai d'agglutinement de latex, lequel détecte une protéine non toxique de *C. difficile* ne démontre pas la présence de *C. difficile* toxigène.

4. Certains isolats toxigènes de *Clostridium sordellii* produisent des toxines similaires dans leurs propriétés biologiques, physico-chimiques et immunologiques aux toxines de *C. difficile*. Ces isolats n'ont toutefois pas été détectés chez les patients atteints de colites et de diarrhées associées aux antibiotiques.
5. Les échantillons fécaux conservés dans 10 % de formol, de formol thimérosal, de formol d'acétate de sodium ou d'alcool polyvinylique ne peuvent pas être utilisés.
6. Les caractéristiques de performance du test *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ n'ont pas été définies de façon précise chez la population pédiatrique.

## VALEURS ATTENDUES

La prévalence d'un test *C. DIFFICILE TOX A/B* positif et de culture tissulaire positive et/ou toxigène était de 5,4 % lors d'une étude et de 8,6 % lors d'une autre. La prévalence peut varier d'un site à un autre, les hôpitaux pouvant constater des taux inférieurs ou supérieurs à ceux observés aux endroits où l'évaluation du test *C. DIFFICILE TOX A/B* a été réalisée. La maladie *Clostridium difficile* est principalement une maladie nosocomiale détectée chez les personnes âgées, les hôpitaux accueillant une population plus importante de patients âgés pouvant présenter des taux plus élevés. Il est important de considérer les résultats des tests en association avec les symptômes cliniques car certains adultes sains et un grand nombre d'enfants sains (jusqu'à 50 %) présentent des résultats positifs à la toxine du *C. difficile* (positifs à la toxine par culture tissulaire ou ELISA). Par ailleurs, on a pu observer des taux compris entre 22 et 32 % de *C. difficile* chez des patients atteints de mucoviscidose (12-14).

## EFFICACITÉ DU TEST

### Évaluation clinique

Le test *C. DIFFICILE TOX A/B TEST* a été comparé au test par culture tissulaire dans quatre hôpitaux américains et en interne au TECHLAB®, Inc. Les échantillons inclus dans l'évaluation ont été soumis au laboratoire clinique pour des tests de routine. Le test par culture tissulaire a été réalisé selon les procédures internes. Le tableau 1 présente une comparaison du test *C. DIFFICILE TOX A/B* par culture tissulaire. Sur les 1 152 échantillons inclus dans l'évaluation, environ 3,6 % provenaient d'enfants âgés de 2 ans ou moins. Aucun échantillon du test *C. DIFFICILE TOX A/B (+)*/culture tissulaire (-) n'a été identifié. Globalement, la sensibilité du test *C. DIFFICILE TOX A/B* est comprise entre 83,3 % et 96 % (indice de confiance de 87,4 et 95,0, p=0,05). La spécificité était de 100 % dans toutes les études. La valeur prédictive positive était de 100 % dans toutes les études et la valeur prédictive négative était comprise entre 90 et 99,5 % (indice de confiance de 93,8 à 99,8, p=0,05). La corrélation était comprise entre 94,9 et 99,5 % (indice de confiance de 96,6 à 99,4, p=0,05).

**TABLEAU 1** Corrélation du test *C. DIFFICILE TOX A/B* avec la culture tissulaire (n=1,152).

	Culture tissulaire positive	Culture tissulaire négative
<i>C. DIFFICILE TOX A/B TEST</i> positif	165	0
<i>C. DIFFICILE TOX A/B TEST</i> négatif	14	973

Sensibilité	92,2%
Spécificité	100%
Corrélation	98,8%
Valeur prédictive positive	100%
Valeur prédictive négative	98,6%

## Comparaison interne

Lors 'une étude réalisée en interne, le test *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ a été comparé avec le test *C. DIFFICILE TOX A/B*. Lors de l'étude, 218 échantillons cliniques représentatifs de ceux soumis régulièrement au laboratoire clinique pour les tests de *C. difficile* ont été évalués. Les résultats obtenus avec les deux tests étaient comparables.

## Centrifugation

Un total de 337 échantillons de selles, dont 30 positifs et 307 négatifs, ont été évalués pour déterminer l'effet de la centrifugation sur la performance. Pour l'analyse, les échantillons ont été dilués et mixés tel que décrit dans la notice jointe. Les échantillons ont été centrifugés (5 000 x g) pour retirer les matières insolubles et le liquide surnageant a été testé avec le test *C. DIFFICILE TOX A/B*. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec le même panel d'échantillons dilués et mixés qui n'avaient pas été centrifugés. Les résultats ont montré une corrélation de 100 % entre les échantillons centrifugés et les échantillons non-centrifugés.

## RÉACTIVITÉ CROISÉE

Différents organismes retrouvés dans les intestins ont été examinés afin de déceler une réactivité croisée dans le test *C. DIFFICILE TOX A/B*. L'analyse a porté sur des cultures en milieu liquide mélangées avec le *Diluant*. Les cultures sur milieu liquide utilisées en phase logarithmique contenaient  $>10^8$  bactéries par ml. Les organismes qui n'ont pas réagi dans les conditions sont présentés dans le tableau 2. Les seuls organismes qui réagissent étaient des *C. difficile* toxigènes et une souche toxigène de *C. sordellii* (souche VPI9048) qui produit des toxines présentant une réactivité croisée importante avec les toxines *C. difficile*. Une souche non toxigène de *C. sordellii* qui ne produit pas de toxine. HT était négative au test. Le *C. sordellii* n'a pas été impliqué dans des colites pseudomembraneuses ou des diarrhées associées aux antibiotiques. Les souches de *C. difficile* toxigènes analysées comprenaient six souches toxigènes peu ou très toxigènes et deux souches non-toxigènes. Le test *C. DIFFICILE TOX A/B* a permis de dépister les six souches toxigènes et n'a pas réagi aux deux souches non toxigènes.

TABLEAU 2 Organismes qui ne réagissent pas au test *C. DIFFICILE TOX A/B*

<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Clostridium novyi</i> (Types A, B, C)	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium perfringens</i> (Types A-E)	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Clostridium septicum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Clostridium sordellii</i> (nontoxicogenic)	<i>Shigella flexneri</i>
(toxigenic/nontoxicogenic)	<i>Clostridium spiroforme</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Clostridium tetani</i>	(Protein A-negative)
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Escherichia coli</i>	(Protein A-positive @ $<10^4$ )
<i>Clostridium botulinum</i> (Types A-G)	<i>Escherichia coli</i> (enterohemorrhagic)	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium chauvoei</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Clostridium difficile</i> (nontoxicogenic)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	

## EFFET DE LA CONSISTANCE DE L'ÉCHANTILLON DE SELLES

Les réactions des échantillons de selles de différentes consistances lors du test *C. DIFFICILE TOX A/B* et l'essai par culture tissulaire sont présentées dans le tableau 3. Les taux des réactions positives étaient similaires dans les trois types d'échantillons de selles. Tous les échantillons ont été soumis au test *C. difficile*. La base de cette soumission est le dossier médical du patient et non pas la consistance de l'échantillon. Dans d'autres études, la toxine A et la toxine B hautement purifiées ont été utilisées pour étudier en solution des échantillons de selles liquides, semi-solides et solides.

TABLEAU 3 Effet de la consistance de l'échantillon

Test	Échantillons liquides	Échantillons semi-solides	Échantillons solides
Nombre d'échantillons (n=435)	150	133	152
Test C. DIFFICILE TOX A/B TEST positif	13 (8,7 %)	11 (8,3 %)	13 (8,6 %)
Culture tissulaire positive	13 (8,7 %)	14 (10,5 %)	15 (9,9 %)

Le test C. DIFFICILE TOX A/B TEST a permis de dépister des toxines A et B dans les échantillons de selles liquides, semi-solides et solides à des niveaux similaires à ceux observés avec la toxine A et la toxine B préparés dans le kit *Diluant*.

## REPRODUCTIBILITÉ ET PRÉCISION

Cinq échantillons de selles (un échantillon négatif et quatre échantillons positifs) ont été envoyés à quatre laboratoires indépendants pour analyse avec le test C. DIFFICILE TOX A/B. Tous les échantillons ont été conservés congelés jusqu'à la réalisation du test. Les résultats de chaque laboratoire ont été comparés aux résultats internes et se sont révélés identiques. Les quatre échantillons positifs ont été confirmés positifs et l'échantillon négatif a été confirmé négatif sur chaque site.

Le coefficient intra-essai de variation (CV) du test C. DIFFICILE TOX A/B a été déterminé en analysant les réactions de 32 contrôles positifs et de 32 contrôles négatifs avec 8 échantillons de selles négatifs. Chaque échantillon de selles a été testé dans 11 micropuits. Le % CV d'intra-essai était de 7,190 avec le contrôle positif, de 6,557 avec le contrôle négatif et de 9,697 avec les échantillons de selles. Le CV inter-essais a été déterminé avec quatre échantillons de selles négatifs et positifs testés à 0, 24, 48 et 72 heures. Le %CV était compris entre 9,9 et 29,6, avec une moyenne de 16,3.

## REFERENCES

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. 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.
5. 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.
6. Lyerly, D.M., L.A. Barroso, and T.D. Wilkins. 1992. Characterization of a toxin A-/toxin B+ isolate of *Clostridium difficile*. Infect. Immun. 60:4633-4639.
7. Lyerly, D.M., L.M. Neville, D.T. Evans, J. Fill, S. Allen, W. Greene, R. Sautter, P. Hnatuck, D.J. Torpey, and R. Schwalbe. 1998. Multicenter Evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B TEST. J. Clin. Micro. 36:184-190.
8. 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.
9. 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.
10. Krivan, H.C., G.F. Clark, D.F. Smith, and T.D. Wilkins. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNac. Infect. Immun. 53:573-581.
11. Data on file.

\*STOOL-PREP™ is a trademark of Medical Packaging Corporation, Camarillo, CA