C. DIFF QUIK CHEK ®

A rapid test for detection of *C. difficile* glutamate dehydrogenase in fecal specimens
Catalog No. 30390 (25 Tests)
IVD *In Vitro* Diagnostic Medical Device
For Canadian Users: Laboratory Use Only

ESPAÑOL p. 10
Un test rápido para la detección de la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile* en muestras fecales
IVD Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*
Prod. No. 30390 (25 Pruebas)

DEUTSCH p. 19
Ein Schnelltest für den Nachweis von *C. difficile* Glutamatdehydrogenase in Stuhlproben
IVD *In-Vitro*-Diagnostikum
Katalognummer. 30390 (25 Tests)

FRANCAISE p. 27
Test rapide pour la détection de glutamate déshydrogénase de *C. difficile* dans les échantillons de selles
Numéro de Catalogue 30390 (25 Analyses)
IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
Pour les utilisateurs Canadiens: Pour usage en laboratoire seulement

Made in the USA

U. S. Patent # 8,343,726

Developed and Manufactured by:

TECHLAB®

2001 Kraft Drive
Blacksburg, VA 24060-6358 USA
www.techlab.com
TEL 1-800-832-4522 USA
TEL 1-540-953-1664 Outside USA

CE EC REP Emergo Europe
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

C. DIFF QUIK CHEK®

INTENDED USE

The *C. DIFF QUIK CHEK*® test is a rapid membrane enzyme immunoassay for use as a screening test to detect *Clostridium difficile* antigen, glutamate dehydrogenase, in fecal specimens from persons suspected of having *C. difficile* disease. The test does not distinguish toxigenic from nontoxigenic strains of *C. difficile*. With the use of additional tests that detect *C. difficile* toxins, the test is to be used as an aid in the diagnosis of *C. difficile* disease. As with other *C. difficile* tests, results should be considered in conjunction with the patient history.

Caution: U.S. Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a physician.

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 toxigenic strains of *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. Toxigenic strains of *C. difficile* carry the genes encoding the toxins while non-toxigenic strains do not carry the toxin genes. The disease results from the toxins that the toxigenic 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). *C. 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 some laboratories. Toxigenic *C. difficile* strains produce both toxins or only toxin B (4-7). The glutamate dehydrogenase of *C. difficile* is a good antigen marker for the organism in feces because it is produced in high amounts by all strains, toxigenic or non-toxigenic (8-10). The antigen can be detected in fecal specimens by using the *C. DIFF QUIK CHEK*® test. A positive result in the test, which is specific for the glutamate dehydrogenase of *C. difficile*, confirms the presence of this organism in a fecal specimen; a negative result indicates the absence of the organism. A positive result should be followed by a toxin-specific test to confirm the presence of toxigenic *C. difficile*.

PRINCIPLE OF THE TEST

The *C. DIFF QUIK CHEK*® test uses antibodies specific for the glutamate dehydrogenase of *C. difficile*. The device contains a *Reaction Window* with two vertical lines of immobilized antibodies (Fig. 1a). The test line (“T”) contains antibodies against *C. difficile* glutamate dehydrogenase. The control line (“C”) contains anti-IgG antibodies. The *Conjugate* consists of antibodies to glutamate dehydrogenase coupled to horseradish peroxidase. To perform the test, the sample is added to a tube containing a mixture of *Diluent* and *Conjugate*. The diluted sample-conjugate mixture is added to the *Sample Well* and the device is allowed to incubate at room temperature for 15 minutes. During the incubation, any glutamate dehydrogenase in the sample binds to the antibody-peroxidase conjugate. The antigen-antibody-conjugate complexes migrate through a filter pad to a membrane where they are captured by the immobilized glutamate dehydrogenase-specific antibodies in the line. The *Reaction Window* is subsequently washed with *Wash Buffer*, followed by the addition of *Substrate*. After a 10 minute incubation period, the “T” reaction is examined visually for the appearance of a vertical blue line on the “T” side of the *Reaction Window*. A blue line indicates a positive test. A positive “C” reaction, indicated by a vertical blue line on the “C” side of the *Reaction Window*, confirms that the test is working properly and the results are valid.

MATERIALS PROVIDED

MEM DEV ***Membrane Devices*** – 25 pouches, each containing 1 device

DIL | SPE ***Diluent* (14 mL)** – Buffered protein solution with graduated dropper assembly (contains 0.05% ProClin® 300)
Signal Word: Warning
H317: May cause an allergic skin reaction
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

WASH | REAG ***Wash Buffer* (12 mL) –** A buffered solution with graduated dropper assembly (contains 0.05% ProClin® 300)
Signal Word: Warning
H317: May cause an allergic skin reaction
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

SUBS | REAG ***Substrate* (3.5 mL) –** Solution containing tetramethylbenzidine

CONJ | ENZ ***Conjugate* (2.0 mL) –** Mouse monoclonal antibody specific for glutamate dehydrogenase coupled to horseradish peroxidase in a buffered protein solution (contains 0.05% ProClin® 300)
Signal Word: Warning
H317: May cause an allergic skin reaction
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501

CONTROL | + ***Positive Control* (1 mL)** – Antigen in a buffered protein solution

Disposable plastic transfer pipettes, 50 (graduated at 25 µL, 400 µL and 500 µL)

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Small test tubes (e.g., plastic Eppendorf tubes)	*Applicator sticks*	*Timer*
Disposable gloves for handling fecal samples	*Pipettor and tips*	*Vortex mixer*

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 should be stored between 2° and 8°C.

PRECAUTIONS

1. Rx Only - Prescription Only
2. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
3. Reagents from different kits should not be mixed. Do not use a kit past the expiration date.
4. Bring all components to ROOM TEMPERATURE BEFORE USE!
5. Caps, tips and dropper assemblies are color-coded; do NOT mix or interchange!
6. Do not freeze the reagents. The kit should be stored between 2° and 8°C.
7. The pouch containing the *Membrane Device* should be at room temperature before opening, and opened just before use. Keep the membrane devices dry before use.
8. Use fecal specimens within 72 hours of collection to obtain optimal results. Specimens that are frozen may lose activity due to freezing and thawing.
9. Specimens that have been preserved in 10% Formalin, merthiolate formalin, sodium acetate formalin or polyvinyl alcohol cannot be used.
10. Specimens in transport media such as Cary Blair and C&S can be used as specified in the specimen preparation protocol.
11. Hold reagent bottles vertically to dispense reagents to ensure consistent drop size.
12. Specimens and membrane devices should be handled and disposed of as potential biohazards after use.
13. Membrane devices cannot be reused.
14. The test has been optimized for sensitivity and specificity. Alterations of the specified procedure and/or test conditions may affect the sensitivity and specificity of the test. Do not deviate from the specified procedure.
15. Microbial contamination of reagents may decrease the accuracy of the assay. Avoid microbial contamination of reagents by using sterile disposable pipettes if removing aliquots from reagent bottles.
16. Be attentive to the total assay time when testing more than one fecal specimen. Add *Diluent* first, then add the *Conjugate* to each tube of *Diluent*. Then add specimen to the tube of *Diluent/Conjugate*. Thoroughly mix all of the diluted specimens, and then

transfer to the *Membrane Device*. The 15-minute incubation step begins after the last diluted sample-conjugate mixture has been transferred to the final *Membrane Device*.

17. If the *Substrate* reagent changes to a dark blue/violet color call technical services for replacement.
18. Wear disposable gloves when doing the test.
19. The *Conjugate*, *Diluen*t, and *Wash Buffer* reagents contain 0.05% ProClin® 300 as a preservative. Although the concentration is low, ProClin® 300 is known to be harmful (skin sensitization may occur). If skin sensitization/irritation or rash occurs, get medical advice/ attention. Take off contaminated clothing and wash it before reuse. Handle reagents according to existing regulations for laboratory safety and good laboratory practice. Safety Data Sheets for this product are available upon request, contact technical support.
20. Follow your national, regional, and local ordinances accordingly for waste disposal regulations.

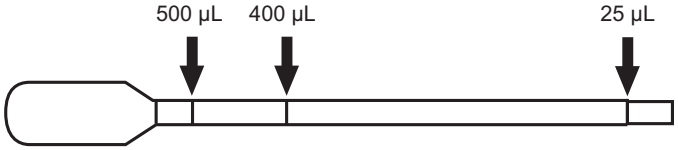
COLLECTION AND HANDLING OF FECAL SPECIMENS

1. Standard collection and handling procedures used in-house for fecal specimens are appropriate. Specimens should be stored between 2° and 8°C; test specimens that are less than 24 hours old, whenever possible.
2. Store specimens frozen (≤ -10°C) if the test cannot be performed within 72 hours of collection, but note that freezing and thawing of the specimen may result in loss of activity due to degradation of the antigen. Do not freeze and thaw multiple times.
3. Make sure that specimens are thoroughly mixed PRIOR to performing the assay.
4. Storing fecal specimens in the *Diluent* is NOT recommended.
5. Do not allow the fecal specimens to remain in the *Diluent* and *Conjugate* for more than 8 hours.

SAMPLE PREPARATION

1. Bring all reagents and the required number of devices to room temperature before use.
2. Set up and label one small tube for each specimen, and optional external controls as necessary.
3. Add 500 µL *Diluent* to each tube for fecal specimens using the graduated black dropper assembly (or equivalent). For specimens in transport media such as Cary Blair or C&S, add 425 µL of *Diluent* to the tube.
4. Holding the dropper bottle in a vertical position, add one drop of *Conjugate* (red capped bottle) to each tube.
5. Obtain one disposable plastic transfer pipette (supplied with the kit) for each sample the pipettes have raised graduations at 25 µL, 400 µL and 500 µL.

Graduated Transfer Pipette:



6. Mix all specimens thoroughly regardless of consistency- it is essential that the specimens be evenly suspended before transferring.
   Liquid/Semi-solid specimens – pipette 25 µL of specimen with a transfer pipette (graduated at 25 µL, 400 µL and 500 µL) and dispense into the *Diluent/Conjugate* mixture. Use the same transfer pipette to mix the diluted specimen.
   Formed/Solid specimens – Care must be taken to add the correct amount of formed fecal specimen to the sample mixture. Mix the specimen thoroughly using a wooden applicator stick and transfer a small portion (approximately 2 mm diameter, the equivalent of 25 µL) of the specimen into the *Diluent/Conjugate* mixture. Emulsify the specimen using the applicator stick.
   Fecal specimens in Cary Blair or C&S transport media - pipette 100 µL of sample into the *Diluent/Conjugate* mixture.

7. **Optional External Control Samples:**
   External Positive Control – holding the dropper bottle in a vertical position, add one drop of *Positive Control* (gray-capped bottle) to the appropriate test tube.
   External Negative Control - add 25 µL *Diluent* to the appropriate test tube using a graduated transfer pipette.

NOTE: Transferring too little specimen, or failure to mix and completely suspend the specimen in the *Diluent* mixture, may result in a false-negative test result. The addition of too much fecal specimen may cause invalid results due to restricted sample flow.

TEST PROCEDURE

1. Obtain one *Membrane Device* per specimen, and one device per optional external positive or negative control as necessary. The foil bags containing the devices should be brought to room temperature before opening. Label each device appropriately and orient it on a flat surface so the letter "C" on the device is on the left, the letter "T" is on the right, and the small *Sample Well* is located in the top right corner of the device (Fig. 1a).
2. Close each tube of diluted specimen and mix thoroughly. Proper mixing can be achieved by vortexing or inverting the tube. Immediately proceed to Step #3.
3. Using a transfer pipette (graduated at 25 µL, 400 µL and 500 µL), transfer 400 µL of the diluted sample-conjugate mixture into the ***Sample Well*** (smaller hole in the top right corner of the device) of a *Membrane Device*, making certain to expel the liquid sample onto the wicking pad inside of the *Membrane Device*.
4. Incubate the device at room temperature for 15 minutes – the sample will wick through the device and a wet area will spread across the *Reaction Window* (larger hole in the middle of the device).
   NOTE FOR SAMPLES THAT FAIL TO MIGRATE:
   Occasionally, a diluted fecal specimen cannot be tested because it clogs the membrane and the Reaction Window does not wet properly. If the diluted fecal specimen fails to migrate properly within 5 minutes of adding the sample to the Sample Well (i.e. the membrane in the Reaction Window does not appear to be completely wet), then add 100 µL (4 drops) of Diluent to the Sample Well and wait an additional 5 minutes (for a total of 20 minutes).
5. After the incubation, add 300 µL of *Wash Buffer* to the ***Reaction Window*** using the graduated white dropper assembly (or equivalent). Allow the *Wash Buffer* to flow through the *Reaction Window* membrane and be absorbed completely.
6. Holding the dropper bottle vertically, add 2 drops of *Substrate* (white-capped bottle) to the ***Reaction Window***. Read and record results visually after 10 minutes.

INTERPRETATION OF RESULTS

1. Interpretation of the test is most reliable when the device is read immediately at the end of the reaction period. Read the device at a normal working distance in a well-lit area. View with a line of vision directly over the device.
2. Observe device for the appearance of a blue line on the "C" side of the *Reaction Window* representing the internal positive control line. Observe device for the appearance of a blue line on the "T" side of the *Reaction Window* representing the test line. The lines may appear faint to dark in intensity.
3. **Positive Result:** A positive result may be interpreted at any time between the addition of *Substrate* and the 10-minute read time. Two blue lines are visible, the control line ("C") and the test line ("T"). The lines may appear faint to dark in intensity. The appearance of a blue line on the "T" side along with a blue control line is interpreted as a positive result. An obvious partial line is interpreted as a positive result. Do not interpret membrane discoloration or shadow as a positive result. A positive result indicates the presence of *C. difficile* antigen.
4. **Negative Result:** A test cannot be interpreted as negative or invalid until 10 minutes following the addition of *Substrate*. A single blue line is visible on the control ("C")

side of the *Reaction Window* and no test line is visible on the "T" side of the *Reaction Window* (Fig. 1b). A negative result indicates *C. difficile* antigen is either absent in the specimen or is below the detection limit of the test.

5. **Invalid Result:** A single line is visible on the test ("T") side of the *Reaction Window,* or no lines are visible in the *Reaction Window* (Fig. 1c, 1d). The test result is invalid if a control line is not present at the completion of the reaction period.

Figure 1. *C. DIFF QUIK CHEK*® INTERPRETATION OF RESULTS

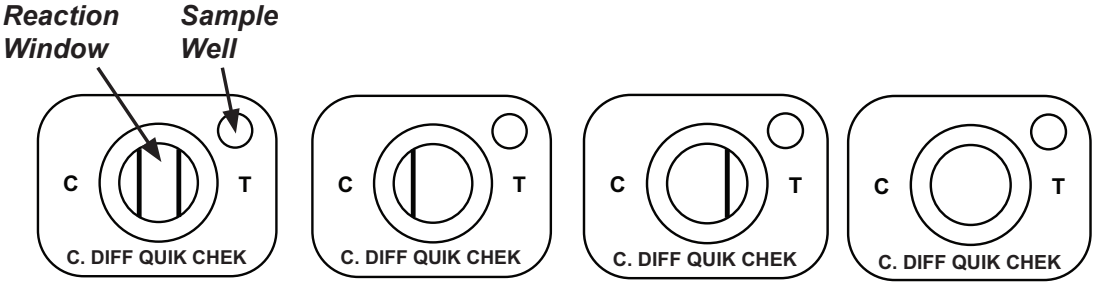


Fig. 1a. Positive ***Fig. 1b. Negative*** ***Fig. 1c. Invalid*** ***Fig. 1d. Invalid***

QUALITY CONTROL

Internal: A blue control line must be visible on the "C" side of the *Reaction Window* on every *Membrane Device* that is tested. The appearance of the blue control line confirms that the sample and reagents were added correctly, that the reagents were active at the time of performing the assay, and that the sample migrated properly through the *Membrane Device*. A clear background in the result area is considered an internal negative control. If the test has been performed correctly and reagents are working properly, the background will be clear to give a discernible result.

External: The reactivity of the *C. DIFF QUIK CHEK*® test should be verified on receipt using the *Positive Control* and negative control (*Diluent*). The *Positive Control* is supplied with the kit (gray-capped bottle). The *Positive Control* confirms the reactivity of the other reagents associated with the assay, and is not intended to ensure precision at the analytical assay cut-off. *Diluent* is used for the negative control. Additional tests can be performed with the controls to meet the requirements of local, state and/or federal regulations and/or accrediting organizations.

LIMITATIONS

1. The *C. DIFF QUIK CHEK*® test is used to detect *C. difficile* antigen in fecal specimens. The test confirms the presence of *C. difficile* glutamate dehydrogenase in feces and this information should be taken under consideration by the physician in light of the clinical history of the patient and the results of toxin detecting tests. A positive result with the *C. DIFF QUIK CHEK*® test DOES NOT confirm the existence of a TOXIGENIC strain of *C. difficile*. If a positive result is seen using the *C. DIFF QUIK CHEK*® test, it is suggested that additional tests be used to confirm the presence of toxin. Alternatively, tissue culture cytotoxicity assay may be performed to verify the presence of toxin.
2. Fecal specimens are extremely complex. Optimal results with the *C. DIFF QUIK CHEK*® test are obtained with specimens that are less than 24 hours old. Most undiluted specimens can be stored between 2° and 8°C for 72 hours before significant degradation of the antigen is noted. If specimens are not assayed within this time period, they may be frozen and thawed. However, freezing and thawing may result in loss in the immunoreactivity of the antigen.
3. Some specimens may give weak reactions. This may be due to a number of factors such as the presence of low levels of antigen, the presence of antigen-binding substances, or inactivating enzymes in the feces. Under these conditions a fresh specimen should be tested. Additional tests that may be used in conjunction with the *C. DIFF QUIK CHEK*® test include isolation of the organism on selective media, toxin-specific ELISAs, or tissue culture cytotoxicity assays for the detection of *C. difficile* and

its toxin. The isolation of the organism does not confirm that the organism is toxigenic. Additional testing of the isolate using a toxin-specific ELISA or tissue culture assay must confirm this.

4. Fecal specimens preserved in 10% formalin, merthiolate formalin, sodium acetate formalin, or polyvinyl alcohol CANNOT be used.
5. The *C. DIFF QUIK CHEK*® test is qualitative. The intensity of the color should not be interpreted quantitatively.
6. Colonization rates of up to 50% have been reported in infants. A high rate has also been reported in cystic fibrosis patients (1,3).
7. The accuracy of the result when testing pediatric patients is uncertain because the performance of *C. DIFF QUIK CHEK*® test of specimens from pediatric patients has been evaluated with a limited number of samples.

EXPECTED VALUES

Clostridium difficile disease is primarily a nosocomial disease of elderly patients, and the frequency of the disease is dependent on factors such as patient population, type of institution and epidemiology. The reported incidence of *C. difficile* disease in patients with antibiotic-associated diarrhea may range from 5 to 20%, and hospitals may experience rates lower or higher than this range. 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. In addition, *C. difficile* carriage rates of 22 to 32% have been reported in cystic fibrosis patients (1,3). Because the *C. DIFF QUIK CHEK*® test detects both toxigenic and non-toxigenic strains of *C. difficile*, the expected values of this test are higher compared to that of any toxin test. A positive result in the *C. DIFF QUIK CHEK*® test confirms the presence of *C. difficile* in a fecal specimen; a negative result indicates the absence of the organism. A positive result should be followed by a toxin-specific test to confirm the presence of toxigenic *C. difficile*. The prevalence of a positive *C. DIFF QUIK CHEK*® test at an independent study site was 18.2% (N=578).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical evaluation

The *C. DIFF QUIK CHEK*® test was compared to the bacterial culture test at two clinical laboratories and in-house at TECHLAB, Inc. Specimens included in the evaluation were submitted to the clinical laboratories for routine testing. The presumptive bacterial culture test was performed according to the in-house procedures. The results are shown in Table 1.

Table 1. Summary of clinical performance comparing *C. DIFF QUIK CHEK*® test to presumptive bacterial culture

n=979	Presumptive Bacterial Culture positive	Presumptive Bacterial Culture negative
***C. DIFF QUIK CHEK*® positive**	206	56
***C. DIFF QUIK CHEK*® negative**	16	701
		95% Confidence Limits
Sensitivity	92.8%	88.3% - 95.7%
Specificity	92.6%	90.4% - 94.3%
Predictive Positive Value	78.6%	73.1% - 83.3%
Predictive Negative Value	97.8%	96.3% - 98.7%
Correlation	92.6%	91.7% - 93.4%

Discrepant samples were resolved using commercial tests for *C. difficile* glutamate dehydrogenase in ELISA or membrane test formats, or by a research PCR assay for the detection of *C. difficile* GDH gene *gluD*. Twenty-nine of the 56 apparent false positive samples were positive by another GDH test, and were considered true positives. Twenty-seven remained false positive. Thirteen of the 16 apparent false negative samples were negative by another GDH test, and were considered true negatives. Three remained false negative.

EFFECT OF FECAL SPECIMEN CONSISTENCY

The reaction of fecal specimens of varying consistencies in the *C. DIFF QUIK CHEK*® test is shown in table 2. A total of 305 fecal samples of known consistency was included in the analysis. The percentages of positive reactions using either resolved culture assay or the *C. DIFF QUIK CHEK*® test were similar in all three types of fecal specimens (liquid, semi-solid, and solid). All of the specimens were submitted for *C. difficile* testing. The basis of the submission was the clinical history of the patient and not the consistency of the specimen. The results show the *C. DIFF QUIK CHEK*® test performed similarly to the culture assay when testing samples of different consistencies.

Table 2. Reaction of fecal specimens of varying consistencies in the *C. DIFF QUIK CHEK*® test

Number of Specimens (n=305)	Liquid Specimens (n = 117)	Semi-solid Specimens (n = 142)	Solid Specimens (n = 46)
Positive by resolved bacterial culture assay	19 (16.2%)	37 (26.1%)	18 (39.1%)
Positive by *C. DIFF QUIK CHEK*®	18 (15.4%)	36 (25.4%)	21 (45.7%)
Negative by resolved bacterial culture assay	98 (83.8%)	105 (73.9%)	28 (60.9%)
Negative by *C. DIFF QUIK CHEK*®	99 (84.6%)	106 (74.6%)	25 (54.3%)

TRANSPORT MEDIA

A total of 69 fecal specimens diluted in C&S Transport Media was tested in the *C. DIFF QUIK CHEK*® test and the results were compared to those obtained by routine testing. The test exhibited an agreement of 95.7% for the detection of *C. difficile* antigen in specimens prepared in Transport Media.

REPRODUCIBILITY

A total of eight fecal specimens, 6 positive and 2 negative were coded to prevent identification and were sent to each of three independent laboratories for analysis using the *C. DIFF QUIK CHEK*® test. The results from each laboratory were compared with in-house results. The positive specimens were confirmed to be positive and the negative specimens were confirmed to be negative at each site.

CROSS REACTIVITY

Fecal specimens inoculated with the following microorganisms to a final concentration of approximately 10^8 or higher organisms per mL did not react in the *C. DIFF QUIK CHEK*® test:

Bacteria: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium bifermentans, Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens* Type A*, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (toxigenic and nontoxigenic), *Clostridium sporogenes, Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli, Escherichia coli* 0157 H7, *Escherichia coli* ETEC, *Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus (Cowans), Staphylococcus epidermidis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

The following viruses of $10^{3.3}$ to $10^{7.5}$ TCID units per 0.2mL did not react in the *C. DIFF QUIK CHEK*® test:
Viruses: Adenovirus types 1,2,3,5,40,41, Human coronavirus, Coxsackievirus B2,B3,B4,B5, Echovirus 9,11,18,22,33, Enterovirus type 68,69,70,71.

INTERFERING SUBSTANCES

The following substances had no effect on test results when present in feces in the concentrations indicated: mucin (3.5% w/v), human blood (40% v/v), barium sulfate (5% w/v), Imodium® (5% w/v), Kaopectate® (5 mg/mL), Pepto-Bismol® (5% w/v), steric/palmitic acid (fecal fats, 40% w/v), Metronidazole (0.25% w/v), Vancomycin (0.25% w/v).

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity of the *C. DIFF QUIK CHEK*® test is 0.8 ng/mL.

C. DIFF QUIK CHEK® − ESPAÑOL

USO PREVISTO

El test *C. DIFF QUIK CHEK*® es un enzimoinmunoensayo rápido de membrana para su uso como test de cribado en la detección del antígeno de *Clostridium difficile*, la glutamato deshidrogenasa, en muestras fecales de personas de las que se sospecha una enfermedad por *C. difficile*. El test no distingue entre las cepas toxigénicas y las no toxigénicas de *C. difficile*. Con el uso de pruebas adicionales que detectan las toxinas de *C. difficile*, este test debe utilizarse como ayuda para el diagnóstico de la enfermedad causada por *C. difficile*. Como ocurre con otros tests para *C. difficile*, los resultados deben evaluarse siempre junto con los antecedentes del paciente.
Precaución: La Ley Federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo o bajo prescripción médica.

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 cepas toxigénicas de *Clostridium difficile* (1). Este microorganismo es una bacteria anaerobia oportunista que crece en el intestino cuando la flora normal está alterada por el antibiótico. Las cepas toxigénicas de *C. difficile* son portadoras de los genes que codifican las toxinas, mientras que las cepas no toxigénicas no contienen estos genes de toxinas. La enfermedad está causada por las toxinas que produce el microorganismo toxigénico. 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). *C. difficile* también produce una segunda toxina, denominada toxina B. La toxina B, que se ha denominado como la citotoxina del microorganismo, se detecta mediante los análisis de cultivos tisulares utilizados actualmente en algunos laboratorios. Las cepas toxigénicas de *C. difficile* producen ambas toxinas o sólo la toxina B (4-7). La glutamato deshidrogenasa de *C. difficile* es un buen marcador antigénico del microorganismo en las heces, porque lo producen en grandes cantidades tanto las cepas toxigénicas como las no toxigénicas (8-10). El antígeno puede detectarse en las muestras fecales con el test *C. DIFF QUIK CHEK*®. Un resultado positivo del test, que es específico para la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile*, confirma la presencia de este microorganismo en una muestra fecal, mientras que un resultado negativo indica la ausencia del microorganismo. Si se obtiene un resultado positivo, deberá realizarse un test específico para la toxina para confirmar la presencia de *C. difficile* toxigénico.

PRINCIPIO DEL TEST

El test *C. DIFF QUIK CHEK*® utiliza anticuerpos específicos frente a la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile*. El dispositivo contiene una *Ventana de reacción* con dos líneas verticales con anticuerpos inmovilizados (Fig. 1a). La línea ("T") del test contiene anticuerpos frente a la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile*. La línea de control ("C") contiene anticuerpos frente a las IgG. El *Conjugado* contiene anticuerpos frente a la glutamato deshidrogenasa unidos a peroxidasa de rábano picante. Para realizar el test, la muestra se añade a un tubo que contiene una mezcla de *Diluyente* y *Conjugado*. La mezcla muestra-conjugado diluida se añade al *Pocillo de muestra* y el dispositivo se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Durante la incubación, cualquier cantidad de glutamato deshidrogenasa presente en la muestra se une al conjugado anticuerpo-peroxidasa. Los complejos antígeno-anticuerpo-conjugado migran a través de un filtro almohadillado a una membrana y los captan los anticuerpos específicos de la glutamato deshidrogenasa inmovilizados en la línea. A continuación, se lava la *Ventana de reacción* con el *Tampón de lavado* y después se añade el *Sustrato*. Tras una incubación de 10 minutos, se comprueba visualmente en la reacción "T" la aparición de una línea azul vertical en el lado "T" de la *Ventana de reacción*. La presencia de una línea azul indica un resultado positivo. Una

reacción positiva “C”, indicada por una línea azul vertical en el lado “C” de la *Ventana de reacción*, confirma que el test funciona adecuadamente y los resultados son válidos.

MATERIALES PROVISTOS

MEM | DEV ***Dispositivos de membrana*** - 25 bolsas, cada una con 1 dispositivo

DIL | SPE ***Diluyente* (14 ml)** – Solución tamponada proteínica con cuentagotas graduado (contiene ProClin® 300 al 0,05%)
Palabra de advertencia: Advertencia

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

WASH | REAG ***Tampón de lavado* (12 ml)** – Solución tamponada con cuentagotas graduado (contiene ProClin® 300 al 0,05%)
Palabra de advertencia: Advertencia

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

SUBS | REAG ***Sustrato* (3.5 ml) –** Solución con tetrametilbenzidina

CONJ | ENZ ***Conjugado* (2.0 ml) –** Anticuerpo monoclonal de ratón específico para la glutamato deshidrogenasa unido a peroxidasa de rábano picante en una solución tamponada de proteínas
(contiene ProClin® 300 al 0,05%)
Palabra de advertencia: Advertencia

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501

CONTROL | + ***Control positivo* (1 ml) –** Antígeno en una solución tamponada de proteínas

Pipetas de plástico desechables, 50 (graduadas a 25 µl, 400 µl y 500 µl)

MATERIALES Y EQUIPAMIENTO NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Tubos de ensayo pequeños (p. ej., tubos de plástico Eppendorf)
Varillas aplicadoras
Cronómetro
Mezclador de tipo vórtex
Pipeta y puntas de pipeta
Guantes desechables para manipular las muestras fecales

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 debe conservarse a una temperatura entre 2 y 8 °C.

PRECAUCIONES

1. Rx Only - Solo con receta
2. Para uso diagnóstico *in vitro*. Exclusivamente para uso profesional.
3. No deben mezclarse los reactivos de kits diferentes. No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
4. ANTES DEL USO atempere todos los componentes hasta alcanzar la TEMPERATURA AMBIENTE.
5. Los tapones, las puntas y los cuentagotas están codificados con colores y NO deben mezclarse.
6. No congelar los reactivos. El kit debe conservarse a una temperatura entre 2° y 8 °C.
7. La bolsa con el *dispositivo de membrana* debe estar a temperatura ambiente antes de la apertura y se abrirá justo antes del uso. Mantenga secos los dispositivos de membrana antes del uso.
8. Las muestras fecales deben analizarse en un plazo no superior a 72 horas desde su recogida para obtener resultados óptimos. En las muestras congeladas puede perderse la actividad de la toxina por los procesos de congelación y descongelación.
9. No pueden utilizarse las muestras conservadas en formol al 10%, formol mertiolato, formol acetato sódico o alcohol polivinílico.
10. Pueden utilizarse las muestras en medios de transporte, como los medios Cary Blair o C&S, de la forma especificada en el protocolo de preparación de las muestras.

11. Cuando añada los reactivos, sujete los frascos de los reactivos en posición vertical con el fin de asegurar que el tamaño de las gotas sea consistente.
12. Las muestras y los dispositivos de membrana deben manipularse y eliminarse después del uso como materiales biológicos potencialmente peligrosos.
13. Los dispositivos de membrana no pueden volver a utilizarse.
14. El test se ha optimizado para mejorar la sensibilidad y la especificidad. Las alteraciones del procedimiento especificado y/o de las condiciones del test puede afectar a su sensibilidad y especificidad. No se desvíe del procedimiento especificado.
15. La contaminación microbiológica de los reactivos puede menoscabar la precisión del análisis. Evitar la contaminación microbiológica de los reactivos utilizando pipetas estériles desechables para extraer alícuotas de los frascos de reactivos.
16. Preste atención al tiempo total del análisis cuando se realice el test con más de una muestra fecal. Añada primero el *Diluyente* y, a continuación, añada el *Conjugado* a cada tubo de *Diluyente*. A continuación, añada la muestra al tubo de *Diluyente/ Conjugado*. Mezcle bien todas las muestras diluidas y, a continuación, transfiéralas al *dispositivo de membrana*. El paso de incubación de 15 minutos comienza después de que se haya transferido la última mezcla muestra-conjugado diluida al *dispositivo de membrana* final.
17. Si el reactivo del *Sustrato* adquiere un color azul oscuro/violeta, avise al Servicio técnico para su sustitución.
18. Utilice guantes desechables para realizar el test.
19. Los reactivos *conjugado, diluyente* y *tampón de lavado* contienen ProClin® 300 al 0,05 % como conservante. Aunque la concentración es baja, se sabe que ProClin® 300 es nocivo (puede producirse sensibilización cutánea). En caso de irritación/sensibilización o erupción cutánea, consulte a un médico. Quítese las prendas contaminadas y lávelas antes de volver a usarlas. Manipule los reactivos de acuerdo con las normas existentes de seguridad de laboratorio y buenas prácticas de laboratorio. Se dispone de fichas de datos de seguridad de este producto bajo pedido; consulte al servicio técnico.
20. Siga las normas nacionales, regionales y locales para consultar los reglamentos de eliminación de residuos.

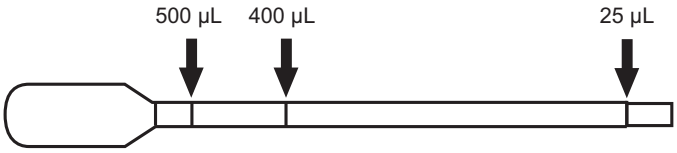
RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS FECALES

1. Los procedimientos internos estándar habituales de recogida y transporte de las muestras fecales son adecuados. Las muestras deben conservarse a una temperatura entre 2 y 8 °C. Siempre que sea posible, las muestras se procesarán en las 24 posteriores a su recogida.
2. Almacene las muestras congeladas (≤ -10 °C) si el test no puede realizarse en las 72 horas siguientes a la recogida de la muestra, pero tenga en cuenta que el congelado y el descongelado de la muestra pueden provocar la pérdida de actividad por la degradación del antígeno. No se debe congelar y descongelar varias veces.
3. Es necesario asegurarse de que las muestras estén completamente mezcladas ANTES de realizar el análisis.
4. NO se recomienda conservar las muestras fecales en el *Diluyente*.
5. No permita que las muestras fecales permanezcan en el *Diluyente* y el *Conjugado* durante más de 8 horas.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Espere hasta que todos los reactivos y el número de dispositivos necesarios estén a temperatura ambiente antes de su uso.
2. Asigne e identifique un tubo pequeño para cada muestra y controles externos opcionales según sea necesario.
3. Añada 500 µl de *Diluyente* a cada tubo de muestras fecales utilizando el cuentagotas negro graduado (o equivalente). En el caso de las muestras en medios de transporte como Cary Blair o C&S, añada 425 µl de *Diluyente* al tubo.
4. Sujete el frasco cuentagotas en posición vertical y añada una gota de *Conjugado* (frasco con tapón rojo) a cada tubo.

5. Obtenga una pipeta de plástico desechable (suministrada con el kit) para cada muestra – las pipetas tienen las graduaciones de 25 µl, 400 µl y 500 µl.
   Pipeta graduada:



6. Mezcle bien todas las muestras independientemente de su consistencia- es muy importante obtener una suspensión homogénea de las muestras antes de transferirlas.
   Muestras líquidas/semisólidas – pipetee 25 µl de muestra con una pipeta (graduada a 25 µl, 400 µl y 500 µl) y añádala a la mezcla de *Diluyente/Conjugado*. **Utilice la misma pipeta para mezclar la muestra diluida.**
   Muestras formes/sólidas – Es preciso tener cuidado para añadir el volumen correcto de la muestra de heces formes a la mezcla de muestra. Mezcle bien la muestra con un palito aplicador de madera y transfiera una porción pequeña (aproximadamente de 2 mm de diámetro, el equivalente de 25 µl) de la muestra a la mezcla de *Diluyente/ Conjugado*. Emulsione la muestra con el palito aplicador.
   Muestras fecales en medios de transporte Cary Blair o C&S - pipetee 100 µl de muestra en la mezcla de *Diluyente/Conjugado*.
7. **Muestras opcionales de control externo:**
   Control positivo externo – sujete el frasco cuentagotas en posición vertical y añada una gota de *Control positivo* (frasco con tapón gris) al tubo de ensayo apropiado.
   Control negativo externo – añada 25 µl de *Diluyente* al tubo de ensayo adecuado con una pipeta graduada.

NOTA: Si se transfiere muy poca muestra o si la muestra no se mezcla y se suspende completamente en la mezcla de *Diluyente*, puede obtenerse un resultado falso negativo del test. Si se añade una cantidad excesiva de heces, los resultados podrían invalidarse al disminuir el flujo de la muestra.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

1. Obtenga un *dispositivo de membrana* por muestra y un dispositivo para el control positivo o negativo externo opcional según sea necesario. Las bolsas de papel de aluminio que contienen los dispositivos deben alcanzar la temperatura ambiente antes de abrirlas. Identifique los dispositivos de forma apropiada y oriéntelos en una superficie plana de forma que la letra “C” del dispositivo se encuentre a la izquierda, la letra “T” se encuentre a la derecha y el *Pocillo de muestra* pequeño se encuentre en la esquina superior derecha del dispositivo (Fig. 1a).
2. Cierre cada tubo de muestra diluida y mézclelo bien. Mezcle adecuadamente con el vórtex o invirtiendo el tubo. Vaya inmediatamente al paso nº 3.
3. Utilice una pipeta (graduada a 25 µl, 400 µl y 500 µl), transfiera 400 µl de la mezcla de muestra-conjugado diluida en el ***Pocillo de muestra*** (orificio más pequeño en la esquina superior derecha del dispositivo) de un *dispositivo de membrana* y asegúrese de que expulsa la muestra líquida en la almohadilla de absorción del interior del *dispositivo de membrana*.
4. Incube el dispositivo a temperatura ambiente durante 15 minutos – la muestra se absorberá a través del dispositivo y el área húmeda se extenderá en la *Ventana de reacción* (orificio más grande situado en el centro del dispositivo).
   NOTA RELATIVA A LAS MUESTRAS QUE NO MIGRAN:
   Ocasionalmente, no es posible realizar el ensayo porque la muestra fecal diluida obstruye las membranas y la Ventana de reacción no se humedece adecuadamente. Si la muestra fecal diluida no migra adecuadamente 5 minutos después de haber añadido la muestra al Pocillo de muestra (es decir, la membrana de la Ventana de reacción no parece estar completamente húmeda), añada 100 µl (4 gotas) de Diluyente al Pocillo de muestra y espere otros 5 minutos (hasta un total de 20 minutos).

5. Después de la incubación, añada 300 µl de *Solución tampón de lavado* a la ***Ventana de reacción*** utilizando el cuentagotas blanco graduado (o equivalente). Deje que la Solución de lavado penetre en la membrana de la *Ventana de reacción* y se absorba completamente.
6. Sujete el frasco cuentagotas en posición vertical y añada 2 gotas de *Sustrato* (frasco con tapón blanco) a la ***Ventana de reacción***. Lea y anote los resultados visualmente después de 10 minutos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. La interpretación del test es más fiable cuando se lee el dispositivo inmediatamente después del periodo de reacción. Lea el dispositivo a una distancia normal en una zona bien iluminada. Visualice el resultado en la línea de visión directamente sobre el dispositivo.
2. Observe la aparición de una línea azul en el lado "C" de la *Ventana de reacción* que representa la línea de control positivo interno. Observe la aparición de una línea azul en el lado "T" de la *Ventana de reacción* que representa la línea de test. El color de las líneas puede ser débil o intenso.
3. **Resultado positivo:** Un resultado positivo puede interpretarse en cualquier momento entre la adición del *Sustrato* y el tiempo de lectura de 10 minutos. Se observan dos líneas azules: la línea de control ("C") y la línea de test ("T"). El color de las líneas puede ser débil o intenso. La aparición de una línea azul en el lado "T" y una línea de control azul se interpreta como un resultado positivo. Una línea parcial visible se interpreta como un resultado positivo. No interprete la decoloración de la membrana o una sombra como un resultado positivo. Un resultado positivo indica la presencia del antígeno de *C. difficile*.
4. **Resultado negativo:** Un test no puede interpretarse como negativo o inválido hasta 10 minutos después de la adición del *Sustrato*. Se observa una sola línea azul en el lado de control ("C") de la *Ventana de reacción* y no se observa una línea de test en el lado "T" de la *Ventana de reacción* (Fig. 1b). Un resultado negativo indica que el antígeno de *C. difficile* está ausente en la muestra o por debajo del límite de detección del test.
5. **Resultado no válido:** Se observa una sola línea en el lado del test ("T") de la *Ventana de reacción* o no se observan líneas en la *Ventana de reacción* (Fig. 1c, 1d). El resultado del test no es válido si no se encuentra presente una línea de control al terminar el periodo de reacción.

Figura 1. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE *C. DIFF QUIK CHEK*®

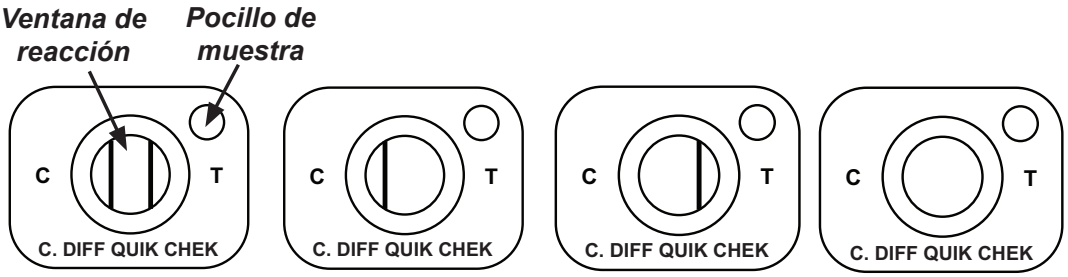


Fig. 1a. Positivo *Fig. 1b. Negativo* *Fig. 1c. No válido* *Fig. 1d. No válido*

CONTROL DE CALIDAD

Interno: Debe observarse una línea azul de control en el lado "C" de la *Ventana de reacción* en cada *dispositivo de membrana*. La aparición de la línea azul de control confirma que se han añadido correctamente la muestra y los reactivos, que los reactivos estaban activos durante la realización del análisis y que la mezcla ha migrado adecuadamente a través del *dispositivo de membrana*. Un fondo transparente en el área de resultados se considera como un control negativo interno. Si el test se ha realizado adecuadamente y los reactivos funcionan correctamente, el fondo será transparente para dar un resultado apreciable.

Externo: La reactividad del test *C. DIFF QUIK CHEK*® debe comprobarse al recibir el kit con el *Control positivo* y el control negativo (*Diluyente*). El *Control positivo* se suministra con el kit (frasco con tapón gris). El *control positivo* se utiliza para verificar la reactividad de los otros reactivos del ensayo y su objetivo no es asegurar la precisión del punto de corte del ensayo. El *Diluyente* se utiliza para el control negativo. Pueden realizarse tests adicionales con los controles para cumplir los requisitos administrativos locales, regionales o federales y/o organismos de acreditación.

LIMITACIONES

1. El test *C. DIFF QUIK CHEK*® se utiliza para detectar el antígeno de *C. difficile* en muestras fecales. El test confirma la presencia de glutamato deshidrogenasa de *C. difficile* en las heces y esta información debe tenerla en cuenta el médico junto con la anamnesis del paciente y los resultados de los tests de detección de toxinas. Un resultado positivo con el test *C. DIFF QUIK CHEK*® NO confirma la presencia de una cepa TOXIGÉNICA de *C. difficile*. Si se observa un resultado positivo con el test *C. DIFF QUIK CHEK*®, se recomienda que se realicen pruebas adicionales para confirmar la presencia de la toxina. Alternativamente, puede emplearse un ensayo de citotoxicidad de cultivo tisular para verificar la presencia de la toxina.
2. Las muestras fecales son muy complejas. Los resultados óptimos del test *C. DIFF QUIK CHEK*® se obtienen con muestras recogidas en las 24 horas previas. La mayoría de las muestras no diluidas pueden conservarse entre 2 y 8 °C durante 72 horas antes de que se produzca una degradación significativa del antígeno. 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, puede perderse la inmunorreactividad del antígeno.
3. En algunas muestras pueden obtenerse reacciones débilmente positivas. Esto puede deberse a diversos factores como la presencia de niveles bajos del antígeno, la presencia de sustancias fijadoras del antígeno o enzimas inactivadoras en las heces. En estas condiciones, el test debe realizarse con una muestra fresca. Otros tests adicionales que pueden utilizarse junto con el test *C. DIFF QUIK CHEK*® son el aislamiento del microorganismo en medios selectivos, los ELISA específicos de la toxina o los ensayos de citotoxicidad en cultivos tisulares para la detección de *C. difficile* y su toxina. El aislamiento del microorganismo no confirma que el microorganismo sea toxigénico. Esto debe confirmarse con tests adicionales como los ELISA específicos para toxina o los ensayos de cultivos tisulares.
4. NO PUEDEN utilizarse las muestras fecales conservadas en formol al 10%, formol mertiolato, formol acetato sódico o alcohol polivinílico.
5. El test *C. DIFF QUIK CHEK*® es un test cualitativo. La intensidad del color no debe interpretarse cuantitativamente.
6. En niños se han descrito índices de colonización de hasta el 50%. Se ha descrito también un elevado índice de colonización en pacientes con fibrosis quística (1,3).
7. La precisión del resultado cuando se analizan muestras pediátricas es incierta, dado que se ha evaluado el funcionamiento del test *C. DIFF QUIK CHEK*® con un número limitado de muestras de pacientes pediátricos.

VALORES ESPERADOS

La enfermedad por *Clostridium difficile* es, sobre todo, una enfermedad nosocomial que afecta a pacientes de edad avanzada y su frecuencia depende de factores como el tipo de paciente, el tipo de institución y factores epidemiológicos. La incidencia de la enfermedad por *C. difficile* en pacientes con diarrea asociada al uso de antibióticos puede variar entre el 5% y el 20% y algunos hospitales pueden presentar tasas superiores o inferiores a este intervalo. 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*. Además, en pacientes con fibrosis quística se han descrito índices de portadores de *C. difficile* de entre

el 22 y 32% (1,3). Como el test *C. DIFF QUIK CHEK*® detecta las cepas toxigénicas y no toxigénicas de *C. difficile*, cabe esperar más resultados elevados que con cualquier otro test que detecte la toxina. Un resultado positivo con el test *C. DIFF QUIK CHEK*® confirma la presencia de *C. difficile* en una muestra fecal, mientras que un resultado negativo indica la ausencia del microorganismo. Si se obtiene un resultado positivo, deberá realizarse un test específico para la toxina para confirmar la presencia de *C. difficile* toxigénico. La prevalencia de un test *C. DIFF QUIK CHEK*® positivo en un centro clínico independiente fue del 18.2% (n = 578).

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Evaluación clínica

Se comparó el test *C. DIFF QUIK CHEK*® con un test de cultivo bacteriano en dos laboratorios clínicos y en un laboratorio interno en TECHLAB, Inc. Las muestras incluidas en la evaluación se remitieron a los laboratorios clínicos para realizar los análisis rutinarios. El test del cultivo bacteriano presunto se realizó de acuerdo con los procedimientos internos. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen del funcionamiento clínico de la comparación del test *C. DIFF QUIK CHEK*® con el cultivo bacteriano presunto

n=979	Cultivo bacteriano presunto positivo	Cultivo bacteriano presunto negativo
Positivo con *C. DIFF QUIK CHEK*®	206	56
Negativo con *C. DIFF QUIK CHEK*®	16	701

		Limites de confianza del 95%
Sensibilidad	92.8%	88.3% - 95.7%
Especificidad	92.6%	90.4% - 94.3%
Valor predictivo positiveo	78.6%	73.1% - 83.3%
Valor predictivo negativo	97.8%	96.3% - 98.7%
Correlación	92.6%	91.7% - 93.4%

Las muestras discrepantes se resolvieron con tests comerciales para la glutamato deshidrogenasa de *C. difficile* en tests de ELISA o con membrana o mediante un ensayo de PCR para la detección del gen *gluD* de la GDH de *C. difficile*. 29 de las 56 muestras aparentemente falso positivas fueron positivas con otro test para GDH y se consideraron como verdaderas positivas. 27 muestras fueron falso positivas. 13 de las 16 muestras aparentemente falso negativas fueron negativas con otro test para GDH y se consideraron como verdaderas positivas. 3 muestras fueron falso negativas.

EFECTO DE LA CONSISTENCIA DE LA MUESTRA FECAL

La reacción de las muestras fecales de diferentes consistencias con el test *C. DIFF QUIK CHEK*® se muestra en la tabla 2. Se incluyó en el análisis un total de 305 muestras fecales con consistencia conocida. Los porcentajes de las reacciones positivas con la prueba de cultivo clarificada o el test *C. DIFF QUIK CHEK*® fueron similares en los tres tipos de muestras fecales (líquidas, semisólidas y sólidas). Todas las muestras se remitieron para el análisis de *C. difficile*. El motivo de la realización del test en las muestras era la anamnesis del paciente con independencia de la consistencia de las heces. Los resultados demuestran que el test *C. DIFF QUIK CHEK*® funcionó de forma similar al cultivo cuando se analizan muestras con consistencias diferentes.

Tabla 2. Reacción de muestras fecales de diferentes consistencias en el test *C. DIFF QUIK CHEK*®

Número de muestras (n = 305)	Muestras líquidas (n = 117)	Muestras semisólidas (n = 142)	Muestras sólidas (n = 46)
Positivas mediante el cultivo bacteriano resuelto	19 (16.2%)	37 (26.1%)	18 (39.1%)
Positivas con *C. DIFF QUIK CHEK*®	18 (15.4%)	36 (25.4%)	21 (45.7%)
Negativas mediante el cultivo bacteriano resuelto	98 (83.8%)	105 (73.9%)	28 (60.9%)
Negativas con *C. DIFF QUIK CHEK*®	99 (84.6%)	106 (74.6%)	25 (54.3%)

MEDIOS DE TRANSPORTE

Se analizó un total de 69 muestras fecales diluidas en medio de transporte C&S con el test *C. DIFF QUIK CHEK*® y se compararon los resultados con los obtenidos mediante análisis rutinarios. El test presentó una concordancia del 95.7% en la detección del antígeno de *C. difficile* en muestras preparadas en medios de transporte.

REPRODUCIBILIDAD

Con el fin de evitar la identificación se codificó un total de 8 muestras fecales, 6 positivas y 2 negativas, y se enviaron a tres laboratorios independientes para el análisis con el test *C. DIFF QUIK CHEK*®. Los resultados de cada laboratorio se compararon con los resultados de los análisis internos. Las muestras positivas se confirmaron como positivas y las muestras negativas se confirmaron como negativas en todos los laboratorios.

REACTIVIDAD CRUZADA

Las muestras fecales inoculadas con los siguientes microorganismos a una concentración final de aproximadamente 10^8 o superior de organismos por ml no reaccionaron con el test *C. DIFF QUIK CHEK*®:

Bacterias: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium bifermentans, Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens* Type A, *Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (toxigénico y no toxigénico), *Clostridium sporogenes, Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli, Escherichia coli* 0157 H7, *Escherichia coli* ETEC, *Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus (Cowans), Staphylococcus epidermidis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

Los siguientes virus de $10^{3.3}$ a $10^{7.5}$ unidades TCID por 0.2 ml no reaccionaron con el test *C. DIFF QUIK CHEK*®:

Virus: tipos 1,2,3,5,40 y 41 del adenovirus, coronavirus humano, virus Coxsackie B2,B3,B4,B5, virus Echo 9,11,18,22,33, tipos 68,69,70,71 del enterovirus.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias no influyeron en los resultados del test cuando se encontraban presentes en las heces en las concentraciones indicadas: mucina (3.5% p/v), sangre humana (40% v/v), sulfato de bario (5% p/v), Imodium® (5% p/v), Kaopectate® (5mg/ml), Pepto-Bismol® (5% p/v), ácido estérico/palmítico (grasas fecales, 40% p/v), metronidazola (0.25% p/v), vancomicina (0.25% p/v).

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica del test *C. DIFF QUIK CHEK*® es de 0.8 ng/ml.

C. DIFF QUIK CHEK® - DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der *C. DIFF QUIK CHEK*® Test ist ein Membranenzymimmunoassay-Schnelltest zur Verwendung als Screening-Test für den Nachweis des *Clostridium difficile*-Antigens Glutamatdehydrogenase (GLDH) in Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf eine *C. difficile*-Erkrankung. Der Test unterscheidet nicht zwischen toxigenen und nicht-toxigenen *C. difficile*-Stämmen. Der Test dient unter Verwendung zusätzlicher Tests für den Nachweis von *C. difficile*-Toxinen als Hilfsmittel bei der Diagnose von *C. difficile*-assoziierten Erkrankungen. Wie auch bei anderen *C. difficile*-Tests sind die Ergebnisse gemeinsam mit der Patientenanamnese zu betrachten.
Achtung: Gemäß US-Bundesgesetz ist der Verkauf dieses Produkts an Ärzte bzw. auf Anordnung eines Arztes beschränkt.

ERLÄUTERUNG

Nach einer Antibiotikabehandlung 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 toxigenen *Clostridium difficile*-Stämmen verursacht (1). Dieser Organismus ist ein opportunistisches anaerobes Bakterium, das sich im Darm ansiedelt, sobald die normale Darmflora durch das Antibiotikum verändert wird. Toxigene *C. difficile*-Stämme enthalten toxinkodierende Gene, während nicht-toxigene Stämme keine Toxingene enthalten. Die Erkrankung ist auf die Toxine zurückzuführen, die der toxigene Organismus produziert. Man geht davon aus, dass die mit der Erkrankung assoziierten klinischen Symptome hauptsächlich von Toxin A verursacht werden, einem gewebeschädigenden Enterotoxin (2,3). *C. difficile* bildet noch ein zweites Toxin, das sogenannte Toxin B. Toxin B, als Zytotoxin des Organismus bezeichnet, ist jenes Toxin, das durch den in einigen Labors eingesetzten Gewebekulturtest nachgewiesen wird. Toxigene *C. difficile*-Stämme bilden entweder beide Toxine oder nur Toxin B (4-7).
Die Glutamatdehydrogenase von *C. difficile* stellt einen guten Antigenmarker für den Stuhlorganismus dar, weil sie von allen Stämmen, toxigen oder nicht-toxigen, in großen Mengen produziert wird (8-10). Das Antigen kann mithilfe des *C. DIFF QUIK CHEK*® Tests in Stuhlproben nachgewiesen werden. Ein positives Testergebnis ist spezifisch für die *C. difficile*-GLDH und bestätigt, dass dieser Organismus in einer Stuhlprobe vorhanden ist. Ein negatives Testergebnis zeigt an, dass der Organismus nicht vorhanden ist. Bei einem positiven Ergebnis sollte zusätzlich ein toxinspezifischer Test durchgeführt werden, um das Vorhandensein toxigener *C. difficile*-Stämme zu bestätigen.

TESTPRINZIP

Bei dem *C. DIFF QUIK CHEK*® Test werden *C. difficile*-GLDH-spezifische Antikörper eingesetzt. Der Test verfügt über ein *Reaktionsfenster* mit zwei vertikalen Linien immobilisierter Antikörper. (Abb. 1a). Die Testlinie (“T”) enthält Antikörper gegen *C. difficile*-GLDH. Die Kontrolllinie (“C”) enthält Anti-IgG-Antikörper. Das *Konjugat* besteht aus an Meerrettich-Peroxidase gebundenen Antikörpern gegen GLDH. Zur Durchführung des Tests wird die Probe einem Reagenzglas, das eine Mischung aus *Verdünnungspuffer* und *Konjugat* enthält, hinzugefügt. Die verdünnte Proben-Konjugatmischung wird in die *Probenvertiefung* gegeben und die Testkarte bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubation bindet die in der Probe vorhandene GLDH an das Antikörper-Peroxidase-Konjugat. Die Antigen-Antikörper-Konjugat-Komplexe migrieren durch ein Filterpad zu einer Membran, wo sie von den immobilisierten GLDH-spezifischen Antikörpern der Linie eingefangen werden. Anschließend wird das *Reaktionsfenster* mit *Waschpuffer* gewaschen und *Substrat* zugegeben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten wird die “T”-Reaktion mittels Sichtkontrolle auf das Erscheinen einer blauen Linie auf der “T”-Seite des *Reaktionsfensters* untersucht. Eine blaue Linie weist auf einen positiven Test hin. Eine positive “C” –Reaktion, angezeigt durch eine vertikale blaue Linie auf der “C”-Seite des *Reaktionsfenster*s, bestätigt, dass der Test ordnungsgemäß funktioniert und die Ergebnisse gültig sind.

PACKUNGSINHALT

MEM | DEV ***Testkarten*** – 25 Beutel mit je 1 Testkarte

DIL | SPE ***Verdünnungspuffer* (14 ml)** – Gepufferte Proteinlösung mit geeichtem Tropfer
(enthält 0,05 % ProClin® 300)
Signalwort: Warnung
H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

WASH | REAG ***Waschpuffer* (12 ml)** – Gepufferte Lösung mit geeichtem Tropfer
(enthält 0,05 % ProClin® 300)
Signalwort: Warnung
H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

SUBS | REAG ***Substrat* (3,5 ml)** – Lösung mit Tetramethylbenzidin

CONJ | ENZ ***Konjugat* (2,0 ml)** – GLDH-spezifischer monoklonaler Maus-Antikörper, gebunden an Meerrettich-Peroxidase in einer gepufferten Proteinlösung
(enthält 0,05 % ProClin® 300)
Signalwort: Warnung
H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501

CONTROL | + ***Positive Kontrolle* (1 ml)** – Antigen in gepufferter Proteinlösung

Einweg-Kunststoffpipetten, 50 Stk. (auf 25 µl, 400 µl und 500 µl geeicht)

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

Kleine Reagenzgläser (z.B. Eppendorf-Reagenzgläser aus Kunststoff)
Holzstäbchen *Zeitmesser* *Vortex-Schüttler*
Einweghandschuhe für Handhabung der Stuhlproben
Pipettierer und Pipettenspitzen

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum des Testkits ist auf dem Packungsetikett angegeben. Die Verfallsdaten für die einzelnen Bestandteile sind auf den jeweiligen Etiketten angegeben. Das Kit muss zwischen 2° und 8 °C gelagert werden.

VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Rx Only - Verschreibungspflichtig
2. *In-vitro*-Diagnostikum. Nur für den professionellen Gebrauch.
3. Reagenzien aus verschiedenen Kits nicht mischen. Verwenden Sie das Testkit nicht nach dem Verfallsdatum.
4. Lassen Sie alle Bestandteile VOR DER VERWENDUNG RAUMTEMPERATUR annehmen!
5. Verschlüsse, Spitzen und Tropfer sind farbkodiert; NICHT vertauschen!
6. Reagenzien nicht einfrieren. Das Kit muss zwischen 2° und 8 °C gelagert werden.
7. Der Beutel mit der *Testkarte* muss vor dem Öffnen Raumtemperatur angenommen haben und darf erst unmittelbar vor dem Gebrauch geöffnet werden. Testkarten vor Gebrauch trocken lagern.
8. Verwenden Sie Stuhlproben innerhalb von 72 Stunden nach Entnahme, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Gefrorene Proben können aufgrund des Einfrier- und Auftauvorganges Aktivitätsverluste aufweisen.
9. Proben, die in 10 % Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol konserviert wurden, dürfen nicht verwendet werden.
10. Proben aus Transportmedien wie Cary Blair oder C&S können nach den Anweisungen im Probenvorbereitungsprotokoll verwendet werden.
11. Halten Sie die Reagenzflaschen bei der Reagenzienausgabe senkrecht, um eine konsistente Tropfengröße sicherzustellen.
12. Proben und Testkarten nach dem Gebrauch als potenzielle biologische Gefahrstoffe behandeln und entsorgen.

13. Die Testkarten dürfen nicht wiederverwendet werden.
14. Der Test wurde auf Sensitivität und Spezifität optimiert. Abweichungen vom angegebenen Verfahren und/oder Änderungen der Testbedingungen können die Sensitivität und Spezifität des Tests beeinflussen. Halten Sie sich genau an die Anweisungen.
15. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien kann die Genauigkeit des Tests beeinträchtigen. Vermeiden Sie mikrobielle Kontaminationen der Reagenzien mithilfe der Verwendung steriler Einweg-Pipetten für die Reagenzienentnahme aus den Flaschen.
16. Achten Sie beim Testen mehrerer Stuhlproben auf die Gesamttestzeit. Geben Sie zuerst den *Verdünnungspuffer*, dann das *Konjugat* in jedes Reagenzglas mit *Verdünnungspuffe*r. Geben Sie hierauf die Probe in das Reagenzglas mit *dem Verdünnungspuffer/Konjugat.* Mischen Sie die verdünnten Proben gründlich durch und geben Sie diese dann auf die *Testkarte*. Der 15-minütige Inkubationsschritt beginnt nach Übertragung der letzten verdünnten Proben-Konjugatmischung auf die letzte *Testkarte*.
17. Sollte die Substratreagenz eine dunkelblaue/violette Färbung annehmen, so wenden Sie sich bitte an den Kundendienst für einen Ersatz.
18. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Einweghandschuhe.
19. Das *Konjugat*, der *Verdünnungspuffer*, und der *Waschpuffer* enthalten 0.05% ProClin® 300 als Konservierungsstoff. Auch wenn die Konzentration gering ist, ist ProClin® 300 als schädlich bekannt (Hautsensibilisierung kann auftreten). Bei Hautsensibilisierung/-reizung ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Reagenzien gemäß vorhandenen Vorschriften für die Laborsicherheit und gute Laborpraxis behandeln. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage erhältlich. Wenden Sie sich an den Kundendienst.
20. Befolgen Sie Ihre nationalen, regionalen und lokalen Verordnungen in Bezug auf die Abfallentsorgung.

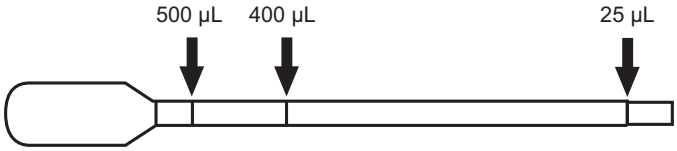
ENTNAHME UND HANDHABUNG DER STUHLPROBEN

1. Die üblichen Labormethoden für Entnahme und Handhabung von Stuhlproben sind geeignet. Die Proben müssen bei Temperaturen zwischen 2 ° und 8 °C gelagert werden. Nach Möglichkeit sollten die Stuhlproben beim Test weniger als 24 Stunden alt sein.
2. Frieren Sie die Proben ein (≤ -10°C), wenn der Test nicht innerhalb von 72 Stunden nach der Entnahme durchgeführt werden kann. Beachten Sie jedoch, dass ein Einfrieren und Auftauen der Proben aufgrund des Zerfalls des Antigens zu Aktivitätsverlusten führen kann. Nicht mehrmals einfrieren und auftauen.
3. Stellen Sie sicher, dass die Proben VOR der Testdurchführung gründlich gemischt werden.
4. Stuhlproben sollten NICHT im *Verdünnungspuffer* gelagert werden.
5. Lassen Sie die Stuhlproben nie länger als 8 Stunden im *Verdünnungspuffer* und *Konjugat*.

VORBEREITUNG DER PROBEN

1. Lassen Sie alle Reagenzien und die erforderliche Anzahl von Testkarten vor der Verwendung Raumtemperatur annehmen.
2. Benutzen Sie für jede Stuhlprobe und zusätzliche externe Kontrollen ein eigenes kleines Reagenzglas und kennzeichnen Sie es.
3. Geben Sie mithilfe des geeichten schwarzen Tropfers (oder Ähnlichem) 500 µl *Verdünnungspuffer* in jedes Reagenzglas mit Stuhlproben. Bei Proben aus Transportmedien wie Cary Blair oder C&S geben Sie 425 µl *Verdünnungspuffer* in das Reagenzglas.
4. Halten Sie die Tropfflasche senkrecht und fügen Sie jedem Reagenzglas einen Tropfen *Konjugat* (Flasche mit rotem Verschluss) bei.

5. Nehmen Sie eine Einweg-Plastiktransferpipette (im Lieferumfang enthalten) für jede robe – die Pipetten sind auf 25 µl, 400 µl und 500 µl geeicht.
   Geeichte Transferpipette:



6. Mischen Sie alle Proben unabhängig von ihrer Konsistenz gründlich durch – eine gleichmäßige Suspension der Proben vor dem Übertragen ist unbedingt erforderlich.
   Flüssige/Halbfeste Proben – Pipettieren Sie 25 µl Probe mit einer Transferpipette (auf 25 µl, 400 µl und 500 µl geeicht) und dispensieren Sie diese in die *Verdünnungspuffer/Konjugat*-Mischung. **Benutzen Sie dieselbe Transferpipette zum Mischen der verdünnten Probe.**
   Feste Stuhlproben – Achten Sie genau darauf, dass Sie der Probenmischung die korrekte Stuhlprobenmenge beifügen. Mischen Sie die Probe gründlich mithilfe eines Holzstäbchens durch und übertragen Sie eine kleine Probenmenge (ca. 2 mm Durchmesser, entspricht der Menge von 25 µl) in die *Verdünnungspuffer/Konjugat*-Mischung. Emulgieren Sie die Probe mit dem Holzstäbchen.
   Proben aus Cary Blair oder C&S -Transportmedien - Pipettieren Sie 100 µl Probe in die *Verdünnungspuffer/Konjugat*-Mischung.
7. **Externe Kontrollproben (optional):**
   Externe positive Kontrolle – halten Sie die Tropfflasche senkrecht und geben Sie einen Tropfen *positive Kontrolle* (Flasche mit grauem Verschluss) in das entsprechende Reagenzglas.
   Externe negative Kontrolle – geben Sie mithilfe einer geeichten Transferpipette 25 µl *Verdünnungspuffer* in das entsprechende Reagenzglas.

BITTE BEACHTEN: Ist die übertragene Probenmenge zu gering oder wird die Probe im *Verdünnungspuffer* nicht ausreichend gemischt und vollständig suspendiert, so kann dies zu einem falsch-negativen Testergebnis führen. Eine zu große Probenmenge kann aufgrund des beeinträchtigten Probenflusses zu ungültigen Ergebnissen führen.

TESTVERFAHREN

1. Wählen Sie eine *Testkarte* pro Probe und eine Testkarte für die zusätzliche externe positive oder negative Kontrolle (optional). Bringen Sie die Folienbeutel mit den Testkarten vor dem Öffnen auf Raumtemperatur. Beschriften Sie jede Karte ordnungemäß und legen Sie diese so auf eine flache Oberfläche, dass sich der Buchstabe “C” links auf der Karte, der Buchstabe “T” rechts und die kleine *Probenvertiefung* in der rechten oberen Ecke der Karte befinden (Abb. 1a).
2. Verschließen Sie alle Reagenzgläser mit den verdünnten Proben und mischen Sie gründlich. Gründliches Mischen erzielen Sie mittels Vortexen oder Umdrehen des Reagenzglases. Gehen Sie sofort zu Schritt 3 über.
3. Mithilfe einer Einweg-Transferpipette (auf 25 µl, 400 µl und 500 µl geeicht) übertragen Sie 400 µl der verdünnten Proben-Konjugatmischung in die ***Probenvertiefung*** (kleineres Loch in der oberen rechten Ecke der Karte) einer *Testkarte.* Stellen Sie dabei sicher, dass die flüssige Probe auf das Wicking-Pad im Inneren der *Testkarte* gelangt.
4. Inkubieren Sie die Testkarte 15 Minuten bei Raumtemperatur – die Probe sickert durch die Karte und eine Feuchtstelle breitet sich im *Reaktionsfenster* (größeres Loch in der Mitte der Testkarte) aus.
   HINWEIS FÜR PROBEN, DIE NICHT MIGRIEREN:
   In manchen Fällen kann eine verdünnte Stuhlprobe nicht getestet werden, weil sie die Membranen verstopft und das Reaktionsfenster nicht richtig feucht wird. Wenn die verdünnte Stuhlprobe innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe der Probe in die Probenvertiefung nicht richtig migriert (d.h. die Membran im Reaktionsfenster ist nicht

vollständig durchfeuchtet), so geben Sie 100 µl (4 Tropfen) Verdünnungspuffer in die Probenvertiefung und warten weitere 5 Minuten (insgesamt 20 Minuten).

5. Nach der Inkubation geben Sie 300 µl *Waschpuffer* in das ***Reaktionsfenster.*** Verwenden Sie dazu den geeichten weißen Tropfer (oder Ähnliches). Warten Sie, bis der *Waschpuffer* durch die Membran des *Reaktionsfensters* geflossen und vollständig absorbiert ist.
6. Halten Sie die Tropfflasche senkrecht und fügen Sie jedem ***Reaktionsfenster*** 2 Tropfen *Substrat* (Flasche mit weißen Verschluss) bei. Ergebnisse nach 10 Minuten visuell ablesen und aufzeichnen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

1. Die Interpretation des Tests ist am verlässlichsten, wenn die Ergebnisse sofort nach Ende der Reaktionszeit abgelesen werden. Lesen Sie die Testkarte bei normalem Arbeitsabstand und in einer gut beleuchteten Umgebung ab. Folgen Sie einer Sichtlinie direkt über der Testkarte.
2. Prüfen Sie, ob auf der "C"-Seite des *Reaktionsfensters* eine blaue Linie, die sogenannte interne Positivkontrolllinie, sichtbar ist. Prüfen Sie, ob eine blaue Linie auf der "T"-Seite des *Reaktionsfensters*, die sogenannte Testlinie, sichtbar ist. Die Farbintensität der Linien kann schwach bis stark sein.
3. **Positives Ergebnis:** Ein positives Ergebnis kann innerhalb des Zeitraums zwischen der Beigabe des *Substrats* und der 10-minütigen Ablesezeit interpretiert werden. Zwei blaue Linien sind sichtbar, die Kontrolllinie ("C") und die Testlinie ("T"). Die Farbintensität der Linien kann schwach bis stark sein. Eine sichtbare blaue Linie auf der "T"-Seite mit gleichzeitiger blauer Kontrolllinie gilt als positives Ergebnis. Eine deutliche Teillinie gilt als positives Ergebnis. Interpretieren Sie Membranverfärbung oder –schatten nicht als positives Ergebnis. Ein positives Ergebnis zeigt an, dass *C. difficile*-Antigen vorhanden ist.
4. **Negatives Ergebnis:** Ein Test kann bis 10 Minuten nach der Beigabe des *Substrat*s nicht als negativ oder ungültig interpretiert werden. Eine einzelne blaue Linie ist auf der Kontrollseite ("C") des *Reaktionsfensters* sichtbar und es ist keine Testlinie auf der "T"-Seite des *Reaktionsfensters* sichtbar (Abb. 1b). Ein negatives Ergebnis zeigt an, dass entweder kein *C. difficile*-Antigen in der Probe vorhanden ist oder der Wert unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt.
5. **Ungültiges Ergebnis:** Eine einzelne Linie ist auf der Testseite ("T") des *Reaktionsfensters* sichtbar oder keine Linien sind im *Reaktionsfenster* sichtbar (Abb. 1c, 1d). Ist auf der Testkarte nach abgeschlossener Reaktion keine Kontrolllinie sichtbar, ist der Test ungültig.

Abbildung 1. ***C. DIFF QUIK CHEK*® INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**

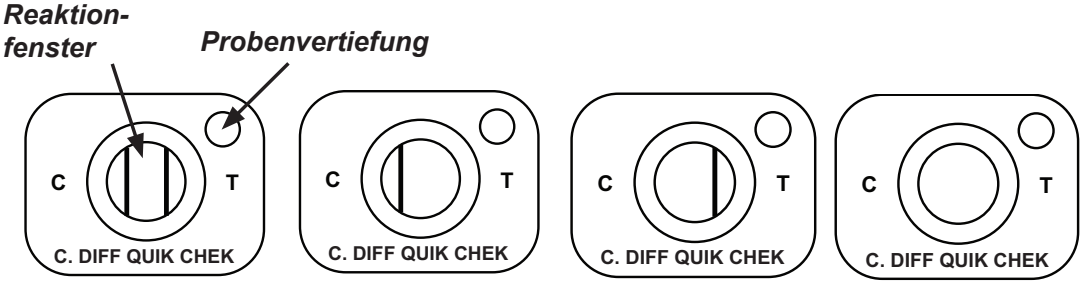


Abb. 1a. Positiv *Abb. 1b. Negativ* *Abb. 1c. Ungültig* *Abb. 1d. Ungültig*

QUALITÄTSKONTROLLE

Intern: Auf jeder *Testkarte* muss nach dem Test eine blaue Kontrolllinie auf der "C" –Seite des *Reaktionsfensters* sichtbar sein. Die blaue Kontrolllinie bestätigt, dass Probe und Reagenzien korrekt zugegeben wurden, dass die Reagenzien während des Testverlaufs aktiv waren und dass eine korrekte Probenmigration durch die *Testkarte* stattgefunden hat. Ein farbloser Hintergrund im Ergebnisbereich gilt als interne negative Kontrolle. Bei korrekt durchgeführtem Test und ordnungsgemäßer Funktion der Reagenzien ist der Hintergrund

farblos, um ein erkennbares Ergebnis zu liefern.

Extern: Die Reaktivität des *C. DIFF QUIK CHEK*® Tests muss bei Erhalt anhand der *positiven Kontrolle* und negativen Kontrolle (*Verdünnungspuffer*) überprüft werden. Die *positive Kontrolle* ist im Kit enthalten (Flasche mit grauem Verschluss). Die *positive Kontrolle* dient zur Überprüfung der Reaktivität der anderen Testreagenzien und ist nicht zur Bestätigung der Verlässlichkeit beim Cut-off gedacht. Als negative Kontrolle wird der *Verdünnungspuffer* verwendet. Es können auch weitere Tests mit den Kontrollen durchgeführt werden, um die Anforderungen lokaler, landes- und/oder bundesweiter Verordnungen und/oder von Zertifizierungsbehörden zu erfüllen.

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Der *C. DIFF QUIK CHEK*® Test dient zum Nachweis von *C. difficile*-Antigen in Stuhlproben. Der Test bestätigt das Vorhandensein von *C. difficile*-GLDH im Stuhl. Diese Information muss vom Arzt unter Berücksichtigung der Patientenanamnese und der Ergebnisse aus Tests für den Nachweis von Toxin interpretiert werden. Ein positives Ergebnis des *C. DIFF QUIK CHEK*® Tests bestätigt NICHT das Vorhandensein eines TOXIGENEN *C. difficile*-Stammes. Sollte mit dem *C. DIFF QUIK CHEK*® Test ein positives Ergebnis erzielt werden, so wird die Durchführung zusätzlicher Tests zur Bestätigung des Vorhandenseins von Toxin empfohlen. Alternativ kann auch ein Gewebekultur-Zytotoxizitätstest zum Nachweis von Toxin durchgeführt werden.
2. Stuhlproben sind überaus komplex. Optimale Ergebnisse werden beim *C. DIFF QUIK CHEK*® Test mit Proben erzielt, die weniger als 24 Stunden alt sind. Die meisten unverdünnten Proben können bei 2 ° und 8 °C für 72 Stunden gelagert werden, bevor ein deutlicher Verfall des Antigens beobachtet wird. Wenn die Proben nicht innerhalb dieses Zeitraums getestet werden, können sie eingefroren und später wieder aufgetaut werden. Einfrieren und Auftauen kann allerdings zu verminderter Immunreaktivität des Antigens führen.
3. Einige Proben können schwach reagieren. Dies kann auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden, wie etwa geringe Antigenkonzentration, bindende Substanzen oder inaktivierende Enzyme im Stuhl. Unter diesen Bedingungen sollte eine neue Stuhlprobe getestet werden. Zusätzliche Tests, die gemeinsam mit dem *C. DIFF QUIK CHEK*® Test durchgeführt werden können, sind Isolierung des Organismus auf selektiven Medien, toxinspezifische ELISA-Tests oder Gewebekultur-Zytotoxizitätstests für den Nachweis von *C. difficile* bzw. seinem Toxin. Die Isolierung des Organismus allein lässt nicht auf Toxin schließen. Dies muss durch zusätzliches Testen des Isolats mit einem toxinspezifischen ELISA oder Gewebekulturtest bestätigt werden.
4. Stuhlproben, die in 10 % Formalin, Merthiolat-Formalin, Natriumacetat-Formalin oder Polyvinylalkohol konserviert wurden, DÜRFEN NICHT verwendet werden.
5. Der *C. DIFF QUIK CHEK*® Test ist qualitativ. Die Farbintensität darf nicht quantitativ interpretiert werden.
6. Bei Kleinkindern wurden Kolonisationsraten von bis zu 50 % beobachtet. Auch bei Mukoviszidose-Patienten wurde eine hohe Rate beobachtet (1,3).
7. Die Genauigkeit der Ergebnisse bei pädiatrischen Patienten ist unsicher, da die Leistung des *C. DIFF QUIK CHEK*® Tests bei Proben pädiatrischer Patienten nur mit einer begrenzten Probenanzahl beurteilt wurde.

ERWARTUNGSWERTE

Clostridium difficile-assoziierte Erkrankungen treten vor allem als nosokomiale Infektionen bei älteren Patienten auf. Die Häufigkeit hängt dabei von Faktoren wie der Patientenpopulation, Art der Anstalt und Epidemiologie ab. *C. difficile*-Erkrankungen bei Patienten mit antibiotikabedingter Diarrhöe wurden mit einer Häufigkeit von 5-20 % festgestellt, Krankenhäuser können aber auch geringere oder höhere Raten aufweisen. Die Testergebnisse müssen immer gemeinsam mit klinischen Symptomen interpretiert werden, denn einige gesunde Erwachsene sowie viele gesunde Kleinkinder (bis zu 50 %) weisen

ein positives Testergebnis für *C. difficile*-Toxin auf. Zudem wurde bei Mukoviszidose-Patienten eine *C. difficile*-Trägerrate von 22-32 % festgestellt (1,3). Da der *C. DIFF QUIK CHEK*® Test sowohl toxigene als auch nicht-toxigene *C. difficile*-Stämme nachweist, sind die Erwartungswerte dieses Tests im Vergleich zu anderen Toxin-Tests höher. Ein positives Ergebnis mit dem *C. DIFF QUIK CHEK*® Test bestätigt, dass *C. difficile* in einer Stuhlprobe vorhanden ist; ein negatives Ergebnis zeigt an, dass der Organismus nicht vorhanden ist. Bei einem positiven Ergebnis sollte zusätzlich ein toxinspezifischer Test durchgeführt werden, um das Vorhandensein toxigener *C. difficile*-Stämme zu bestätigen. Die Prävalenz eines positiven *C. DIFF QUIK CHEK*® Tests an einem unabhängigen Studienstandort betrug 18,2% (N=578).

LEISTUNGSDATEN

Klinische Beurteilung

Der *C. DIFF QUIK CHEK*® Test wurde mit Bakterienkultur in zwei klinischen Labors sowie intern bei TECHLAB, Inc verglichen. Die dabei untersuchten Proben wurden für Routinetests in die klinischen Labors eingesandt. Die präsumtive Bakterienkultur wurde nach internen Verfahren durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Zusammenfassung der klinischen Leistung beim Vergleich des *C. DIFF QUIK CHEK*® Tests mit präsumtiver Bakterienkultur

n=979	Präsumtive Bakterienkultur positiv	Präsumtive Bakterienkultur negativ
***C. DIFF QUIK CHEK*® positiv**	206	56
***C. DIFF QUIK CHEK*® negativ**	16	701
		95 %-Konfidenzgrenzen
Sensitivität	92,8%	88,3% - 95,7%
Spezifität	92,6%	90,4% - 94,3%
Positiver Vorhersagwert	78,6%	73,1% - 83,3%
Negativer Vorhersagewert	97,8%	96,3% - 98,7%
Korrelation	92,6%	91,7% - 93,4%

Abweichende Proben wurden unter Verwendung handelsüblicher Tests für den Nachweis von *C. difficile*-GLDH in Form von ELISA oder Membrantests bzw. anhand eines PCR-Forschungstests für den Nachweis des *C. difficile* GDH-Gens *gluD* aufgelöst. 29 der 56 scheinbaren falsch-positiven Proben lieferten bei einem weiteren GDH-Test ein positives Ergebnis und wurden als echt positiv betrachtet. 27 blieben falsch-positiv. 13 der 16 scheinbaren falsch-negativen Proben lieferten bei einem weiteren GDH-Test ein negatives Ergebnis und wurden als echt negativ betrachtet. 3 blieben falsch-negativ.

AUSWIRKUNGEN DER STUHLKONSISTENZ

Die Reaktion der Stuhlproben unterschiedlicher Konsistenz im *C. DIFF QUIK CHEK*® Test ist in Tabelle 2 dargestellt. Insgesamt wurden 305 Stuhlproben mit bekannter Konsistenz analysiert. Der Prozentanteil an positiven Reaktionen war bei Verwendung von aufgelöster Kultur oder des *C. DIFF QUIK CHEK*® Tests bei allen drei Stuhlprobentypen (flüssig, halbfest und fest) ähnlich. Alle Proben wurden auf *C. difficile* getestet. Ob eine Probe getestet wurde oder nicht, hing von der Krankengeschichte des Patienten, nicht von der Probenkonsistenz ab. Die Ergebnisse zeigen, dass der *C. DIFF QUIK CHEK*® Test und Kultur beim Testen von Proben mit unterschiedlicher Konsistenz eine ähnliche Leistung erbrachten.

Tabelle 2. Reaktion von Stuhlproben unterschiedlicher Konsistenz beim *C. DIFF QUIK CHEK*® Test

Anzahl der Proben (n=305)	Flüssige Proben (n = 117)	Halbfeste Proben (n = 142)	Feste Proben (n = 46)
Positiv bei aufgelöster Bakterienkultur	19 (16,2%)	37 (26,1%)	18 (39,1%)
Positiv beim *C. DIFF QUIK CHEK*®	18 (15,4%)	36 (25,4%)	21 (45,7%)
Negativ bei aufgelöster Bakterienkultur	98 (83,8%)	105 (73,9%)	28 (60,9%)
Negativ beim *C. DIFF QUIK CHEK*®	99 (84,6%)	106 (74,6%)	25 (54,3%)

TRANSPORTMEDIEN

Insgesamt wurden 69 in C&S Transportmedien verdünnte Stuhlproben mit dem *C. DIFF QUIK CHEK*® Test getestet. Die Ergebnisse wurden mit jenen aus Routinetests verglichen. Der Test wies eine Übereinstimmung von 95,7% für den Nachweis von *C. difficile*–Antigen in Proben aus Transportmedien auf.

REPRODUZIERBARKEIT

Insgesamt wurden 8 Stuhlproben, 6 positive und 2 negative, zur Identifikationsverhinderung kodiert und in alle drei unabhängigen Labors zur Analyse mit dem *C. DIFF QUIK CHEK*® Test eingesandt. Die Ergebnisse der einzelnen Labors wurden mit internen Ergebnissen verglichen. An jedem Standort wurden die positiven Proben als positiv und die negativen Proben als negativ bestätigt.

KREUZREAKTIVITÄT

Mit folgenden Mikroorganismen (bis zu einer Endkonzentration von ca. 10^8 oder mehr Organismen/ml) beimpfte Stuhlproben zeigten beim *C. DIFF QUIK CHEK*® Test keine Reaktion:

Bakterien: *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium bifermentans, Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens* Typ A*, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (toxigen und nicht-toxigen), *Clostridium sporogenes, Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli, Escherichia coli* 0157 H7, *Escherichia coli* ETEC, *Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus (Cowans), Staphylococcus epidermidis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

Folgende Viren ($10^{3,3}$ - $10^{7,5}$ TCID-Einheiten/0,2 ml) zeigten im *C. DIFF QUIK CHEK*® Test keine Reaktion:

Viren: Adenoviren 1,2,3,5,40,41, humaner Coronavirus, Coxsackievirus B2,B3,B4,B5, Echovirus 9,11,18,22,33, Enteroviren 68,69,70,71.

INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Die folgenden Substanzen wirkten sich, wenn in den angegebenen Konzentrationen im Stuhl vorhanden, nicht auf die Testergebnisse aus: Mucin (3,5% w/v), humanes Blut (40% v/v), Bariumsulfat (5% w/v), Imodium® (5% w/v), Kaopectate® (5 mg/ml), Pepto-Bismol® (5% w/v), Stearinsäure/Palmitinsäure (Stuhlfette, 40% w/v), Metronidazol (0,25% w/v), Vancomycin (0,25% w/v).

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität des *C. DIFF QUIK CHEK*® Tests beträgt 0,8 ng/ml.

C. DIFF QUIK CHEK® - FRANÇAIS

UTILISATION PRÉVUE

Le test *C. DIFF QUIK CHEK*® est un immunoessai d'enzyme membranaire rapide utilisé pour effectuer un test de dépistage permettant de détecter l'antigène du *Clostridium difficile*, la glutamate déshydrogénase, dans les selles, chez des personnes susceptibles de souffrir de la maladie *C. difficile*. Le test ne distingue pas les souches de *C. difficile* toxinogènes des souches non-toxinogènes. Associé à des tests complémentaires pour la détection des toxines *C. difficile*, ce test contribue au diagnostic de la maladie *C. difficile*. Ses résultats doivent, comme pour tous les autres tests *C. difficile*, être évalués en tenant compte des antécédents du patient.

Attention : selon la loi fédérale des États-Unis, ce dispositif ne peut être vendu que par un médecin ou sur ordonnance.

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 dues à des souches toxinogènes de *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. Les souches toxinogènes de *C. difficile* sont porteuses de gènes qui codent les toxines alors que les souches non toxinogènes ne sont pas porteuses de gènes de toxines. La maladie est le résultat des toxines produites par l'organisme toxinogène. 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 *C. 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. Les souches toxinogènes du *C. difficile* produisent les deux toxines ou uniquement la toxine B (4-7). La glutamate déshydrogénase de *C. difficile* est un bon marqueur antigénique pour l'organisme qui se trouve dans les selles car elle est produite en grandes quantités par toutes les souches, qu'elles soient toxinogènes ou non toxinogènes (8-10). L'antigène peut être détecté dans les échantillons de selles via le test *C. DIFF QUIK CHEK*®. Un résultat positif au test, spécifique à la glutamate déshydrogénase de *C. difficile*, confirme la présence de cet organisme dans les selles. Un résultat négatif indique l'absence de cet organisme. Un résultat positif doit être suivi d'un test spécifique aux toxines afin de confirmer la présence de *C. difficile* toxinogènes.

PRINCIPE DU TEST

Le test *C. DIFF QUIK CHEK*® utilise des anticorps spécifiques à la glutamate déshydrogénase de *C. difficile*. Le dispositif comporte une *Fenêtre de réaction* avec deux lignes verticales d'anticorps immobilisés (Fig. 1a). La bandelette du test ("T") comporte des anticorps contre la glutamate déshydrogénase de *C. difficile*. La bandelette de contrôle ("C") contient des anticorps anti-IgG. Le *Conjugué* est composé d'anticorps contre la glutamate déshydrogénase conjugués à la peroxydase de raifort. Pour réaliser le test, l'échantillon est ajouté à un tube contenant un mélange de *Diluant* et de *Conjugué*. Le mélange conjugué-échantillon dilué est placé dans la *Coupelle de test* et le dispositif est soumis à une période d'incubation de 15 minutes à température ambiante. Pendant l'incubation, toute la glutamate déshydrogénase de l'échantillon se mélange avec le conjugué peroxydase-anticorps. Les complexes conjugués-anticorps-antigènes migrent à travers un filtre vers une membrane où ils sont capturés par les anticorps immobilisés spécifiques à la glutamate déshydrogénase sur la bandelette. La *Fenêtre de réaction* est ensuite lavée avec un *Tampon de lavage* puis remplie de *Substrat*. Au bout de 10 minutes d'incubation, la réaction "T" et l'apparition d'une ligne bleue verticale du côté "T" de la *Fenêtre de réaction s*ont observées. Une ligne bleue indique un test positif. Une réaction positive "C", indiquée par une ligne bleue verticale du

côté du “C” de la *Fenêtre de réaction*, confirme que le test fonctionne correctement et que les résultats sont valides.

MATÉRIEL FOURNI

MEM | DEV — ***Dispositifs à membranes*** – 25 sachets contenant chacun 1 dispositif

DIL | SPE — ***Diluant* (14 ml) –** Solution tamponnée et protéinée avec compte-gouttes gradué (contient du ProClin® 300 0,05 %)
Mot indicateur : Avertissement
H317 : Risque de réactions cutanées allergiques
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P364, P501

WASH | REAG — ***Tampon de lavage* (12 ml) –** Solution tamponnée avec compte-gouttes gradué (contient du ProClin® 300 0,05 %)
Mot indicateur : Avertissement
H317 : Risque de réactions cutanées allergiques
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501

SUBS | REAG — ***Substrat* (3,5 ml) –** Solution contenant du tétraméthylbenzidine

CONJ | ENZ — ***Conjugué* (2,0 ml) –** Anticorps monoclonal de souris spécifique à la glutamate déshydrogénase conjugué à la peroxydase de raifort dans une solution tamponnée et protéinée
(contient du ProClin® 300 0,05 %)
Mot indicateur : Avertissement
H317 : Risque de réactions cutanées allergiques
P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501

CONTROL | + — ***Contrôle positif* (1 ml) –** Antigène dans une solution tamponnée et protéinée

***Pipettes de transfert jetables en plastique* –** 50 (graduées à 25 µl, 400 µl et 500 µl)

MATIÈRES ET MATÉRIEL NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Petits tubes à essai (par exemple des tubes en plastique Eppendorf)
Écouvillons *Minuterie* *Agitateur vortex*
Pipetteur et embouts
Gants jetables pour manipuler les échantillons de selles

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 doit être conservé à une température comprise entre 2° et 8°C.

PRÉCAUTIONS À PRENDRE

1. Rx Only - Sur ordonnance uniquement
2. Pour une utilisation diagnostique *in vitro*. Uniquement à usage professionnel.
3. Les réactifs des différents kits ne doivent pas être mélangés. Ne pas utiliser de kit dont la date d’expiration serait dépassée.
4. Placer tous les composants à TEMPÉRATURE AMBIANTE AVANT UTILISATION !
5. Les capsules, les embouts et les compte-gouttes sont classés par couleur. Ne pas les mélanger !
6. Ne pas congeler les réactifs. Le kit doit être conservé à une température comprise entre 2° et 8°C.
7. Le sachet contenant le *Dispositif à membrane* doit avoir été conservé à température ambiante avant d’être ouvert et il doit être ouvert juste avant son utilisation. Maintenir les dispositifs à membranes au sec avant de les utiliser.
8. Utiliser les échantillons de selles dans les 72 heures suivant le prélèvement, et ce afin d’obtenir les meilleurs résultats possibles. Les échantillons congelés peuvent être moins actifs suite à la congélation et à la décongélation.
9. Les échantillons conservés dans du formol à 10 %, de formol thimérosal, dans du formol d’acétate de sodium ou de l’alcool polyvinylique ne peuvent pas être utilisés.

10. Les échantillons introduits dans un milieu de transport tel qu'un Cary Blair ou un C&S peuvent être utilisés conformément aux indications dans le protocole de préparation des échantillons.
11. Verser les réactifs en tenant les flacons à réactifs verticalement de façon à dispenser une goutte de taille adéquate.
12. Après leur utilisation, les échantillons et les dispositifs à membranes doivent être manipulés et jetés de la même façon que des matières présentant un danger biologique.
13. Les dispositifs à membranes ne peuvent pas être réutilisés.
14. Le test a été optimisé dans le sens de la sensibilité et de la spécificité. Toute modification de la procédure spécifiée et/ou des conditions de test peut altérer la sensibilité et la spécificité du test. Procéder conformément à la procédure spécifiée.
15. La contamination microbienne des réactifs peut réduire l'exactitude de l'analyse. Éviter la contamination microbienne des réactifs en utilisant des pipettes stériles jetables pour extraire les aliquotes des flacons à réactifs.
16. Vérifier la durée totale de l'analyse si plusieurs échantillons de selles sont testés. Ajouter d'abord le *Diluant* puis le *Conjugué* dans chaque tube de *Diluant*. Introduire ensuite l'échantillon dans le tube de *Diluant/Conjugué*. Mélanger complètement tous les échantillons dilués puis les transférer dans le *Dispositif à membrane*. L'étape d'incubation de 15 minutes commence dès que le dernier mélange conjugué-échantillon dilué est transféré sur le dernier *Dispositif à membrane*.
17. Si le *Substrat* prend une couleur bleu foncé / violet, appeler les services techniques pour procéder à un remplacement.
18. S'équiper de gants jetables pendant le test.
19. Les réactifs du *Conjugué, Diluant* et *Tampon de lavage* contiennent 0,05 % de ProClin® 300 comme conservateur. Même si la concentration est faible, le ProClin® 300 est connu pour sa nocivité (risque de sensibilisation de la peau). En cas de sensibilisation/irritation de la peau ou d'éruption cutanée, consulter un médecin. Les vêtements contaminés doivent être ôtés puis lavés avant d'être réutilisés. Manipuler les réactifs selon les réglementations existantes relatives à la sécurité des laboratoires et les bonnes pratiques de laboratoire. Les fiches de sécurité de ce produit sont disponibles à la demande. Contacter le support technique.
20. Respecter les arrêtés locaux, régionaux et nationaux relatifs aux réglementations sur l'élimination des déchets.

PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

1. Les procédures standard utilisées sur place pour le prélèvement et la manipulation des échantillons de selles sont appropriées. Les échantillons doivent être stockés à une température comprise entre 2° et 8°C. Utiliser de préférence des échantillons de moins de 24 heures.
2. Congeler les échantillons (≤ -10°C) si le test ne peut être réalisé dans un délai de 72 heures après le prélèvement. Attention : la congélation et la décongélation d'un échantillon peuvent entraîner une perte d'activité due à la dégradation de l'antigène. Ne pas congeler et décongeler plusieurs fois.
3. Veiller à ce que les échantillons soient bien mélangés AVANT de réaliser l'essai.
4. Le stockage des échantillons de selles dans le *Diluant* est déconseillé.
5. Ne pas laisser les échantillons de selles dans le *Diluant* et le *Conjugué* pendant une période supérieure à 8 heures.

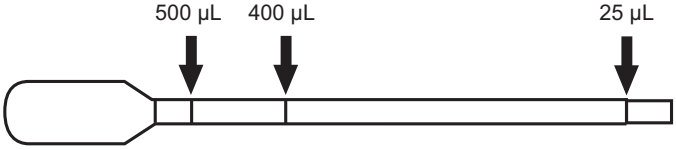
PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

1. Placer tous les réactifs et le nombre de dispositifs nécessaires à température ambiante avant de les utiliser.
2. Préparer et étiqueter un petit tube à essai pour chaque échantillon et pour chaque contrôle supplémentaire externe.
3. Ajouter 500 µl de *Diluant* dans chaque tube à échantillons de selles à l'aide du compte-gouttes noir gradué (ou équivalent). Pour les échantillons provenant d'un milieu de

transport tel qu'un Cary Blair ou un C&S, ajouter 425 µl de *Diluant* dans le tube.

4. En tenant le compte-gouttes à la verticale, ajouter une goutte de *Conjugué* (bouteille à capsule rouge) dans chaque tube.
5. Prendre une pipette de transfert jetable en plastique (fournie avec le kit) pour chaque échantillon – les pipettes sont graduées à 25 µl, 400 µl et 500 µl.

Pipette de transfert graduée :



6. Mélanger complètement tous les échantillons indépendamment de leur consistance. Les échantillons doivent tous être parfaitement suspendus avant transfert.
   Échantillons liquides ou semi-solides – Prélever 25 µl d'échantillon avec une pipette de transfert (graduée à 25 µl, 400 µl et 500 µl) puis verser l'échantillon dans le mélange de *Diluant/Conjugué*. **Utiliser la même pipette de transfert pour mélanger l'échantillon dilué.**
   Échantillons formés ou solides – Veiller à ajouter la quantité adéquate d'échantillons de selles formées au mélange témoin. Mélanger complètement l'échantillon à l'aide d'un écouvillon en bois et transférer un petit fragment (de 2 mm de diamètre environ, équivalent à 25 µl) de l'échantillon dans le mélange de *Diluant/Conjugué*. Émulsionner l'échantillon à l'aide de l'écouvillon.
   Échantillons de selles provenant d'un milieu de transport tel qu'un Cary Blair ou un C&S – Prélever 100 µl d'échantillon et les introduire dans le mélange de *Diluant/ Conjugué*.
7. **Échantillons témoins externes facultatifs :**
   Contrôle positif externe – En tenant le compte-gouttes en position verticale, ajouter une goutte de *Contrôle positif* (bouteille à capsule grise) dans le tube à essai approprié.
   Contrôle négatif externe – Ajouter 25 µl de *Diluant* dans le tube à essai approprié en utilisant une pipette de transfert graduée.

REMARQUE : Si le fragment transféré est trop petit, si le mélange est défectueux ou si l'échantillon n'est pas complètement suspendu dans le mélange dilué, les résultats obtenus peuvent se révéler faussement négatifs. Une trop grande quantité de selles peut donner des résultats nuls à cause du débit limité.

PROCÉDURE DE TEST

1. Prendre un *Dispositif à membrane* par échantillon et un dispositif par contrôle facultatif externe positif ou négatif. Les sachets en aluminium contenant les dispositifs doivent être mis à température ambiante avant ouverture. Étiqueter correctement chaque dispositif et les placer sur une surface plane de telle sorte que la lettre "C" du dispositif soit du côté gauche, la lettre "T" du côté droit et que la *Coupelle de test* soit située dans le coin supérieur droit du dispositif (Fig. 1a).
2. Fermer chaque tube d'échantillon dilué et mélanger complètement. Pour obtenir un mélange approprié, procéder par mixage ou agitation du tube. Passer immédiatement à l'étape #3.
3. À l'aide d'une pipette de transfert (graduée à 25 µl, 400 µl et 500 µl), transférer 400 µl du mélange échantillon-conjugué dilué dans la ***Coupelle de test*** (petite cavité située dans le coin supérieur droit du dispositif) d'un *Dispositif à membrane*, en veillant à bien expulser l'échantillon liquide sur la garniture perméable située à l'intérieur du *Dispositif à membrane*.
4. Laisser incuber le dispositif à température ambiante pendant 15 minutes – l'échantillon sera absorbé par le dispositif et une zone humide apparaîtra dans la *Fenêtre de réaction* (grande cavité située au centre du dispositif).

NOTE CONCERNANT LES ÉCHANTILLONS NE MIGRANT PAS :
Il peut arriver qu'un échantillon de selles dilué ne puisse pas être analysé parce qu'il obstrue la membrane et la Fenêtre de réaction ne s'imbibe pas correctement. Si l'échantillon de selles dilué ne semble pas migrer correctement 5 minutes après avoir versé l'échantillon dans la Coupelle de test (si la membrane de la Fenêtre de réaction ne semble pas être complètement humide), ajouter 100 µl (4 gouttes) de Diluant dans la Coupelle de test et attendre 5 minutes supplémentaires (20 minutes au total).

5. Après incubation, ajouter 300 µl de *Tampon de lavage* à l'aide du compte-gouttes blanc gradué (ou équivalent) dans la ***Fenêtre de réaction***. Laisser le *Tampon de lavage* pénétrer la *Fenêtre de réaction* et veiller à ce qu'il soit complètement absorbé.
6. En tenant le compte-gouttes en position verticale, verser 2 gouttes de *Substrat* (bouteille à capsule blanche) dans la ***Fenêtre de réaction***. Lire et consigner les résultats visuels observés au bout de 10 minutes.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. L'interprétation du test est plus fiable lorsque le dispositif est lu immédiatement à la fin de la période de réaction. Lire le dispositif à une distance normale dans une pièce bien éclairée en regardant directement le dessus du dispositif à la verticale.
2. Observer l'apparition d'une ligne bleue du côté "C" de la *Fenêtre de réaction* : c'est la bandelette de contrôle positif interne. Observer l'apparition d'une ligne bleue du côté "T" de la *Fenêtre de réaction* : c'est la bandelette de test. Les bandelettes peuvent présenter une couleur légèrement foncée.
3. **Résultat positif :** Un résultat positif peut être interprété à tout moment entre l'adjonction de *Substrat* et le temps de lecture (10 minutes). Deux lignes bleues sont visibles : la bandelette de contrôle ("C") et la bandelette de test ("T"). Les bandelettes peuvent présenter une couleur légèrement foncée. L'apparition d'une ligne bleue du côté "T" et d'une bandelette de contrôle bleue est interprétée comme résultat positif. Une ligne partielle évidente est interprétée comme résultat positif. La décoloration ou l'assombrissement de la membrane ne peuvent être interprétés comme résultats positifs. Un résultat positif indique la présence d'antigène *C. difficile*.
4. **Résultat négatif :** Les tests ne peuvent pas être interprétés comme négatifs ou invalides moins de 10 minutes après l'adjonction du *Substrat*. Une ligne bleue simple est visible du côté contrôle ("C") de la *Fenêtre de réaction* et aucune ligne de test n'est visible du côté "T" de la *Fenêtre de réaction* (Fig. 1b). Un résultat négatif indique soit l'absence d'antigène *C. difficile* dans l'échantillon, soit un taux inférieur à la limite de détection du test.
5. **Résultat nul :** Une ligne simple est visible du côté test ("T") de la *Fenêtre de réaction* ou aucune ligne n'est visible dans la *Fenêtre de réaction* (Fig. 1c, 1d). Le résultat du test est invalide si aucune ligne de contrôle n'est visible à l'issue de la période de réaction.

Figure 1. ***C. DIFF QUIK CHEK*® INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

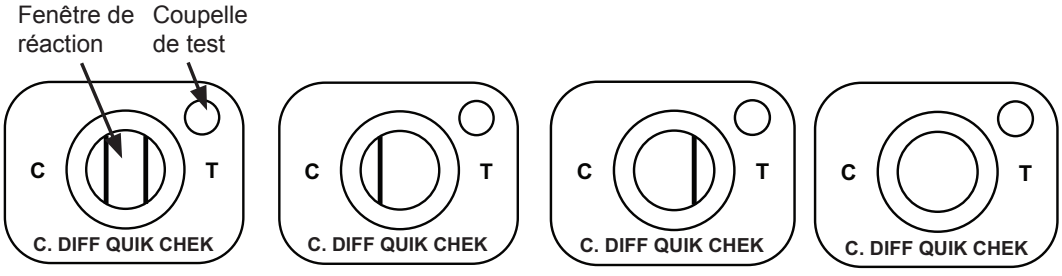


Fig. 1a. Positif ***Fig. 1b. Négatif*** ***Fig. 1c. Nul*** ***Fig. 1d. Nul***

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Interne : Une bandelette de contrôle bleue doit être visible du côté “C” de la *Fenêtre de réaction* sur chaque *Dispositif à membrane* testé. L’apparition de la bandelette de contrôle bleue confirme que l’échantillon et les réactifs ont été correctement ajoutés, que les réactifs étaient actifs au moment de la réalisation de l’essai et que l’échantillon a bien migré via le *Dispositif à membran*e. Un résultat clairement hors essai est considéré comme contrôle interne négatif. Si le test a été réalisé correctement et les réactifs fonctionnent, le résultat hors essai sera clair afin de fournir un résultat discernable.

Externe : La réactivité du test *C. DIFF QUIK CHEK*® doit être vérifiée dès réception à l’aide du *Contrôle positif* et du contrôle négatif (*Diluant*). Le *Contrôle positif* est fourni avec le kit (bouteille à capsule grise). Le *Contrôle positif* permet de confirmer la réactivité des autres réactifs associés à l’essai mais il ne permet pas de garantir la précision à la fin de l’essai analytique. Le *Diluant* est utilisé pour le contrôle négatif. Des tests supplémentaires peuvent être réalisés à l’aide des contrôles pour répondre aux exigences des réglementations locales, nationales et/ou fédérales et/ou des organismes d’accréditation.

LIMITES

1. Le test *C. DIFF QUIK CHEK*® est utilisé pour détecter l’antigène *C. difficile* dans des échantillons de selles. Ce test confirme la présence de glutamate déshydrogénase de *C. difficile* dans les selles et ces informations doivent être examinées par le médecin avec le dossier médical du patient et les résultats des tests de détection de toxines. Un résultat positif au test *C. DIFF QUIK CHEK*® NE confirme PAS l’existence d’une souche de *C. difficile* TOXINOGÈNE. Si un résultat positif est observé en utilisant le test *C. DIFF QUIK CHEK*®, il est conseillé de recourir à des tests complémentaires afin de confirmer la présence de la toxine. On peut aussi réaliser un essai de cytotoxicité par culture cellulaire pour vérifier la présence de la toxine.
2. Les échantillons de selles sont extrêmement complexes. Le test *C. DIFF QUIK CHEK*® permet d’obtenir des résultats optimaux si les échantillons de selles ont été prélevés moins de 24 heures à l’avance. La plupart des échantillons non dilués peuvent être stockés à une température comprise entre 2º et 8ºC pendant 72 heures avant qu’une dégradation significative ne puisse être observée. Si les échantillons ne sont pas testés pendant cette période, ils peuvent être congelés puis décongelés. Toutefois, la congélation et la décongélation peuvent entraîner l’immunoréactivité de l’antigène.
3. Certains échantillons peuvent créer des réactions faibles. Ce phénomène peut découler d’un certain nombre de facteurs tels que la présence de faibles quantités d’antigène, la présence de substances anticorps ou la désactivation des enzymes dans les selles. Le cas échéant, tester un échantillon frais. Des tests supplémentaires peuvent être réalisés en association avec le test *C. DIFF QUIK CHEK*®. Ils comprennent notamment l’isolement de l’organisme dans un milieu sélectif, des tests ELISA spécifiques à la toxine ou des essais de cytotoxicité par culture tissulaire permettant de détecter le *C. difficile* et sa toxine. L’isolement de l’organisme ne permet pas de confirmer que l’organisme est toxinogène. Un test supplémentaire de l’isolat réalisé via la méthode ELISA spécifique à la toxine ou un essai par culture tissulaire permet de le confirmer.
4. Les échantillons de selles conservés dans du formol à 10 %, de formol thimérosal, dans du formol d’acétate de sodium ou de l’alcool polyvinylique NE peuvent PAS être utilisés.
5. Le test *C. DIFF QUIK CHEK*® est un test qualitatif. L’intensité de la couleur ne doit pas être interprétée en termes quantitatifs.
6. Des taux d’infestation pouvant atteindre 50 % ont été signalés chez des enfants. Un niveau élevé a également été signalé chez des patients atteints de mucoviscidose (1,3).
7. La précision des résultats sur les patients pédiatriques est peu sûre, les performances du *C. DIFF QUIK CHEK*® ayant été évaluées sur un nombre limité d’échantillon provenant de ce type de patients.

VALEURS ATTENDUES

La maladie *Clostridium difficile* est principalement une maladie nosocomiale détectée chez les personnes âgées et la fréquence de cette maladie dépend de facteurs tels que la population des patients, le niveau d'éducation et l'épidémiologie. Les incidences de la maladie *C. difficile* signalées chez des patients présentant des diarrhées associées aux antibiotiques sont comprises entre 5 et 20 %, les hôpitaux pouvant présenter des taux supérieurs ou inférieurs à ces chiffres. 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*. Par ailleurs, on a pu observer des taux compris entre 22 et 32 % de *C. difficile* chez des patients atteints de mucoviscidose (1,3). Comme le test *C. DIFF QUIK CHEK*® permet de détecter des souches toxinogènes et non toxinogènes de *C. difficile*, les valeurs moyennes de ce test sont supérieures à celles des tests de toxines. Un résultat positif du test *C. DIFF QUIK CHEK*® confirme la présence du *C. difficile* dans un échantillon de selles et un résultat négatif indique l'absence de cet organisme. Un résultat positif doit être suivi d'un test spécifique à la toxine afin de confirmer la présence de *C. difficile* toxinogène. La prévalence d'un test *C. DIFF QUIK CHEK*® positif sur un site d'étude indépendant était de 18,2 % (N=578).

EFFICACITÉ DU TEST

Evaluation clinique

Le test *C. DIFF QUIK CHEK*® a été comparé au test de culture bactérienne dans deux laboratoires cliniques et dans les locaux de TECHLAB, Inc. Les échantillons inclus dans l'évaluation ont été soumis aux tests de routine des laboratoires cliniques. Le test de présomption de culture bactérienne a été réalisé selon les procédures internes de l'établissement. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Résumé des performances cliniques comparant le test *C. DIFF QUIK CHEK*® à la présomption de culture bactérienne

n=979	Présomption de culture bactérienne positive	Présomption de culture bactérienne négative
***C. DIFF QUIK CHEK*® positif**	206	56
***C. DIFF QUIK CHEK*® négatif**	16	701
		Indice de confiance de 95%
Sensibilité	92,8%	88,3% - 95,7%
Spécificité	92,6%	90,4% - 94,3%
Valeur prédictive positive	78,6%	73,1% - 83,3%
Valeur prédictive négative	97,8%	96,3% - 98,7%
Corrélation	92,6%	91,7% - 93,4%

Les échantillons contradictoires ont été obtenus en utilisant des tests commerciaux à base de glutamate déshydrogénase de *C. difficile* aux formats ELISA et membranaires, ou par une analyse par PCR pour la détection du gène GDH *gluD* de *C. difficile.* Vingt-neuf des 56 échantillons apparemment faussement positifs se sont révélés positifs à un autre test GDH, et ont été considérés comme effectivement positifs. Ving-sept échantillons sont restés faussement positifs. Treize des 16 échantillons apparemment faussement négatifs se sont révélés négatifs à un autre test GDH, et ont été considérés comme effectivement négatifs. Trois échantillons sont restés faussement négatifs.

EFFET DE LA CONSISTANCE DE L'ÉCHANTILLON DE SELLES

La réaction d'échantillons de selles de consistances variables au test *C. DIFF QUIK CHEK*® est présentée au tableau 2. 305 échantillons de selles de consistance connue ont été inclus dans l'analyse. Les pourcentages de réactions positives s'appuyant sur un essai de culture résolu ou sur le test *C. DIFF QUIK CHEK*® étaient similaires pour les trois types d'échantillons de selles (liquides, semi-solides et solides). Tous les échantillons ont été soumis au test *C. difficile*. A l'origine de cette soumission, on trouve les antécédents médicaux du patient et non la consistance des échantillons. Les résultats montrent que les performances du test *C. DIFF QUIK CHEK*® sont équivalentes à celles d'un essai en culture lorsque les échantillons testés sont de consistances différentes.

Tableau 2. Réaction au test *C. DIFF QUIK CHEK*® d'échantillons de selles de consistances différentes

Nombre d'échantillons (n=305)	Échantillons liquides (n = 117)	Échantillons semi-solides (n = 142)	Échantillons solides (n = 46)
Positif para essai de culture bactérienne résolu	19 (16,2%)	37 (26,1%)	18 (39,1%)
Positif par *C. DIFF QUIK CHEK*®	18 (15,4%)	36 (25,4%)	21 (45,7%)
Négatif para essai de culture bactérienne résolu	98 (83,8%)	105 (73,9%)	28 (60,9%)
Négatif par *C. DIFF QUIK CHEK*®	99 (84,6%)	106 (74,6%)	25 (54,3%)

MILIEU DE TRANSPORT

Un total de 69 échantillons de selles dilués en milieu C&S a été testé à l'aide du test *C. DIFF QUIK CHEK*® et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par les tests de routine. La détection d'antigène *C. difficile* dans les échantillons dilués en milieu de transport concordait à 95,7%.

REPRODUCTIBILITÉ

Un total de huit échantillons de selles, 6 échantillons positifs et 2 négatifs, ont été codés pour éviter leur identification et envoyés à chacun des trois laboratoires indépendants en vue de procéder à une analyse reposant sur le test *C. DIFF QUIK CHEK*®. Les résultats de chaque laboratoire ont été comparés aux résultats internes. Les échantillons positifs ont été confirmés positifs et les échantillons négatifs ont été confirmés négatifs sur chaque site.

RÉACTIVITÉ CROISÉE

Les échantillons de selles inoculés à l'aide des micro-organismes suivants, pour une concentration finale d'environ 10^8 ou supérieure d'organismes par ml, n'ont pas réagi au test *C. DIFF QUIK CHEK*® :

Bactéries : *Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Clostridium bifermentans, Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens* Type A*, Clostridium septicum, Clostridium sordellii* (toxigenic and nontoxigenic), *Clostridium sporogenes, Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli, Escherichia coli* 0157 H7, *Escherichia coli* ETEC, *Klebsiella pneumoniae, Peptostreptococcus anaerobius, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus (Cowans), Staphylococcus epidermidis, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*

Les virus suivants, à des TCID de $10^{3,3}$ à $10^{7,5}$ par 0,2 ml, n'ont pas réagi au test *C. DIFF QUIK CHEK*® :
Virus : Adénovirus types 1,2,3,5,40,41, Coronavirus humain, Coxsackievirus B2,B3,B4,B5, Échovirus 9,11,18,22,33, Entérovirus type 68,69,70,71.

INTERFÉRENCES ANALYTIQUES

Les substances suivantes n'ont pas modifié le résultat des tests lorsqu'elles étaient présentes dans les selles aux concentrations indiquées ci-après : mucine (3,5 % p/v), sang humain (40 % v/v), sulfate de baryum (5 % p/v), Imodium® (5 % p/v), Kaopectate® (5 mg/ml), Pepto-Bismol® (5 % p/v), acide stérique/palmitique (40 % p/v), Métronidazole (0,25 % p/v), Vancomycine (0,25 % p/v).

SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

La sensibilité analytique du test *C. DIFF QUIK CHEK*® est de 0,8 ng/ml.

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. 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.
8. Zheng, L., S. F. Keller, D. M. Lyerly, R. J. Carman, C. W. Genheimer, C. A. Gleaves, S. J. Kohlhepp, S. Young, S. Perez, and K. Ye. 2004. Multicenter Evaluation of a New Screening Test that Detects *Clostridium difficile* in Fecal Specimens. J. Clin. Microbiol. **42:**3837-3840.
9. Miles, B. L., J. A. Siders, and S. D. Allen. 1988. Evaluation of a commercial latex test for *Clostridium difficile* for reactivity with *C. difficile* and cross-reactions with other bacteria. J. Clin. Microbiol. **26**:2452-2455.
10. Lyerly, D. M., and T. D. Wilkins. 1986. Commercial latex test for *Clostridium difficile* Toxin A does not detect Toxin A. J. Clin. Microbiol. **23**:622-623.

Technical Support

Further information can be obtained from contacting TECHLAB® Technical Support:

US +1 800 TECHLAB

Phone (540) 953-1664

Fax (540) 953-1665

Email ts@techlab.com

© 2023 TECHLAB, Inc. All rights reserved.

C. DIFF QUIK CHEK, the TECHLAB Logo, and TECHLAB are trademarks of TECHLAB, Inc. Proclin is a trademark of Rohm and Haas Company.

All other trademarks referenced are trademarks of their respective owners.

RMS #91-390-01-TL **Issued: 03/2023**