

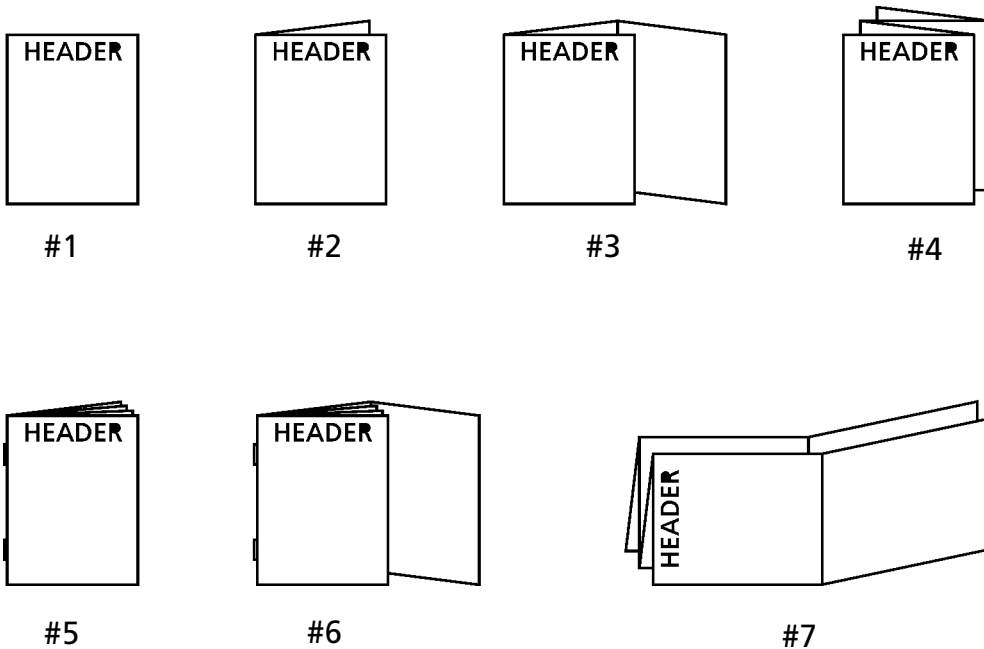
Revisions

SO 0191-5

Rev from	Rev to	ECO #
0503	0806	4112-06

Notes:

1. BD Cat. Number 274030
2. Blank (Sheet) Size: Length: N/A Width: N/A
 Number of Pages: N/A Number of Sheets: N/A
 Page Size: Length N/A Width N/A Final Folded Size: N/A
3. Style (see illustrations below): # N/A



4. See Specification Control Number 8809761 for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides Yes No
 No. of Colors: N/A PMS# N/A
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level

Label Design	Date	COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION	Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA			
Proofer	Date			Category and Description Package Insert, ColorPAC Toxin A	Sheet: 1 of 37	A
Checked By	Date				Scale: N/A	
Part Number: 8809761JAA						

BD ColorPAC™ Toxin A

For the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin A

English: pages 1 – 7
 Français: pages 7 – 13
 Deutsch: Seiten 13 – 20

Italiano: pagine 20 – 26
 Español: páginas 27 – 33

 8809761JAA
 2006/08

U.S. Pat. 4,743,560; 4,703,017; 4,855,240; 4,695,554; 4,529,561; 5,617,023; 5,369,036; 5,567,591

See symbol glossary at end of insert. / Viz popis symbolů na konci příbalového letáku. / Se symbolglossaret i slutningen af indlægssedlen. / Zie lijst met symbolen aan het einde van de bijsluiter. / Vaadake sümbole seletust infolehe lõpus. / Katso pakkauselosteen lopussa olevaa kuvamerkkien sanastoa. / Voir le glossaire des symboles à la fin de la notice. / Siehe Symbol-Erklärungen am Ende der Packungsbeilage. / Δείτε το γλωσσάριο των συμβόλων στο τέλος του ένθετου. / A jelmagyarázat a használati utasítás végén található. / Vedere il glossario dei simboli alla fine del foglio illustrativo. / Zr. informacinio lapelio pabaigoje pateikiamą simbolių glosarijų. / Se i symbolforklaringen på slutten av produktvedlegget. / Zobacz objaśnienie symboli na końcu ulotki. / Consulte o glossário de símbolos no fim do folheto informativo. / Pozri slovník symbolov na konci letáka. / Consulte el glosario de símbolos al final del prospecto. / Se symbolförteckningen vid slutet av bipacksedeln.

Pokyny vám poskytne miestni zástupce spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőtől. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Instrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar.

INTENDED USE

ColorPAC™ Toxin A Test is a rapid chromatographic assay for the qualitative detection of *Clostridium difficile* toxin A (enterotoxin) in stool specimens from patients suspected of having *C. difficile*-associated disease. The test can also be used for confirmation of suspect colonies of toxigenic *C. difficile* from agar plates or BHI broth. This assay is intended for use as an aid in the diagnosis of *C. difficile*-associated disease.

SUMMARY AND EXPLANATION

C. difficile is an important cause of antibiotic-associated diarrhea, which in its most serious form can result in the clinical syndrome of pseudomembranous colitis with significant mortality. Although *C. difficile* may be part of the normal bacterial intestinal flora, it may become an opportunistic pathogen following the patient's treatment with antibiotics and subsequent alteration of the normal intestinal flora. Under the proper conditions, toxin-producing strains of *C. difficile* produce two toxins: toxin A, a tissue damaging enterotoxin, and toxin B, an in vitro cytotoxin.¹ The literature indicates that both toxin A and toxin B are produced at the same time.² The clinical symptoms associated with the disease are thought to be mainly due to toxin A, and to date, there is not convincing evidence that toxin B has any important biological activity in naturally-occurring disease.³

The most common clinical diagnostic aids for *C. difficile* antibiotic-associated colitis have been cell culture cytotoxicity assays (CTA), latex agglutination (LA), and enzyme immunoassays (EIA).⁴ CTA detects toxin B through the cytopathic effect on cell culture and requires one to two days to complete. Latex agglutination detects the antigens of *C. difficile* rather than the specific toxins, but is regarded as a valuable rapid assay in establishing whether there is an etiologic role for *C. difficile* in patients with diarrhea.⁵ Microwell enzyme immunoassays can detect toxin A, or in some cases, both toxin A and toxin B simultaneously.⁶

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The ColorPAC Toxin A Test is comprised of a capture *C. difficile* toxin A antibody immobilized on a chromatographic test strip which is contained within a test device. A specimen (i.e., stool, colonies, or BHI broth) is diluted with sample buffer and added to the sample well of the test device. The diluted sample wicks up the test strip by capillary action. Toxin A, if present, binds to the capture antibody at the test line as the specimen migrates across the test strip. The wash and remaining reagents are added to the reagent well of the test device.

Upon addition of Detector A, toxin A antibody-coated liposomes containing a pink dye migrate across the test strip and attach to the *C. difficile* toxin A antigen that was bound to the test strip in the previous step. Color formation is enhanced upon addition of a second liposome reagent, Detector B that binds to the complex formed between Detector A and sample antigen at the test line. Following the final wash, the reactions are read visually. If toxin A antigen is detected in the specimen, a pink test line and a pink control line will appear, indicating a positive result. In the absence of toxin A, only the pink control line will appear, indicating a negative result.

REAGENTS

ColorPAC Toxin A Test Kit:

Reagent 1	(30.0 mL)	Sample Buffer: Buffered saline with a mucolytic agent, 1% detergent.
Reagent 2	(1.5 mL)	Detector A: Rabbit <i>C. difficile</i> toxin A antibody-coated liposomes.
Reagent 3	(1.5 mL)	Detector B: Rabbit antibody-coated liposomes specific for Detector A.
Reagent W	(2.3 mL)	Wash Reagent: Buffered saline solution with bovine protein stabilizer, 0.1% detergent.
Control +	(1.0 mL)	Positive Control: Buffered saline solution with bovine protein stabilizer, inactivated <i>C. difficile</i> toxin A.

- Control –** (1.0 mL) Negative Control: Buffered saline solution with bovine protein stabilizer.
Reagents and controls each contain 0.2% sodium azide (preservative).
- 30 Test Devices Each containing a test strip coated with monoclonal *C. difficile* toxin A antibody and *C. difficile* toxin A.
- 30 SQ-EASY™ Tubes and Filter Tips.
- 30 each Applicator Sticks and Transfer Pipets.
- 1 Dropper Rod

Warnings and Precautions:

For *in vitro* Diagnostic Use.

Reagents: Upon receipt, refrigerate the kit or remove the carton of reagents requiring refrigeration and store at 2 – 8°C. DO NOT FREEZE. Reagents should be recapped immediately and returned to refrigeration when not in use, taking care not to mix color-coded caps. Do not use beyond the expiration date. Upon removal from the refrigerator, allow reagents to warm to room temperature before use. Avoid prolonged exposure of reagents to strong light.

Do not interchange, mix, or combine reagents and devices from different kit lots.

To assure proper drop delivery, hold the reagent dispensing bottle vertically, dispensing one free-falling drop at a time.

Warning: Reagents contain sodium azide. Very toxic by inhalation, in contact with skin, and if swallowed. Contact with acids liberates very toxic gas. After contact with skin, wash immediately with plenty of water. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up.

Test Devices: Do not remove test device from pouch until just prior to use. Store unopened devices at room temperature (15 – 30°C) or refrigerate (2 – 8°C) if desired. Do not expose unused devices to repeated cycling between refrigerated and room temperatures. Single use; do not reuse.

Controls: Do not use the kit if the positive and negative controls do not yield appropriate results. The positive control is made with inactivated *C. difficile* toxin A and should be handled as potentially hazardous material.

Transfer Pipets: Single use; do not reuse.

Filter Tips: Tip must contain white filter material to ensure proper test performance. Single use; do not reuse. Ensure that the filter tip snaps into place so that the top rim of the filter tip is flush with the top of the SQ-EASY tube.

Warning: Pathogenic microorganisms, including hepatitis viruses and Human Immunodeficiency Virus, may be present in clinical specimens. "Standard Precautions"⁷⁻¹⁰ and institutional guidelines should be followed in handling all items contaminated with blood and other body fluids.

Dispose of all materials used in performing the test into a receptacle approved for biohazardous waste. The samples may be autoclaved for 60 min at 121°C or by treatment with a 0.05% solution of sodium hypochlorite (1:100 dilution of household bleach) for 30 min. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Collect stool specimens into a clean air-tight container with no preservative. Testing of specimens should be performed as soon as possible upon receipt in the laboratory; however, storage for up to 72 h at 2 – 8°C is permissible. If specimens are to be tested after 72 h, they should be frozen at -70°C immediately upon receipt in the laboratory. Specimens may be frozen up to 2 months. Positive specimens will show little or no reduction in toxin A detected by ColorPAC Toxin A after three freeze-thaw cycles.

Allow stool specimens to warm to room temperature and mix as thoroughly as possible before use.

ColorPAC Toxin A test results are not affected by ampicillin, cephalixin, metronidazole, vancomycin, barium sulfate, laxatives, blood, and antidiarrheal medications that may be present in stool.

It is suggested that tests for *C. difficile* or its toxins be performed on diarrheal (unformed) stool specimens.⁷

PROCEDURE

Materials Provided: All materials as listed under "Reagents."

Materials Required But Not Provided: Vortex mixer and timer, micropipettor; (optional: Brain Heart Infusion Broth or *C. difficile* selective agar needed only for toxin A detection in *C. difficile* culture isolates, centrifuge capable of 1500 x g — re. Assay Procedure point-1).

Performance of Test: Review "Precautions" and "Specimen Collection and Handling" prior to performing procedures. The testing area, reagents, test specimens, and test components should be at room temperature prior to testing.

Gently mix all reagents several times by inverting prior to use. Avoid foaming.

STOOL SPECIMEN PREPARATION – Refer to Illustrations, Back Cover

1. With a micropipettor or supplied dropper rod, add 1 mL of **Reagent 1** (Sample Buffer) to one SQ-EASY tube for each sample to be tested.
2. Mix stool specimen as thoroughly as possible. For liquid or semi-solid stools, pipet 0.5 mL specimen into tube containing **Reagent 1** using a provided transfer pipet. For solid stools, use an applicator stick or wood spatula provided to pick up two pea size samples (0.5g) from separate areas of the specimen and transfer to the tube containing **Reagent 1**. Cap the tube with a filter tip prior to vortexing.
3. Vortex the tube for 15 sec at high speed. The diluted sample is ready for use. Proceed to Assay Procedure.

COLONY AND BHI BROTH SPECIMEN PREPARATION – (i.e., optional)**Toxin A Testing from Plated Media Culture:**

1. Locate suspected colonies on the agar surface from 42 – 48 h cultures meeting morphological and Gram stain characteristics of *C. difficile*.
2. With a micropipettor or supplied dropper rod, add 1 mL of **Reagent 1** (Sample Buffer) to a 12 x 75 mm culture tube. Aseptically transfer suspected isolated colonies sufficient to achieve a 2.0 McFarland turbidity.
3. Make a visual comparison of the bacterial suspension to a 2.0 McFarland standard. Use additional **Reagent 1** to adjust to a 2.0 McFarland turbidity if necessary.
4. Vortex the tube for 15 sec at high speed. The diluted sample is ready for use.
5. Proceed to Assay Procedure.

Toxin A Testing from BHI Broth:

1. With a micropipettor or supplied dropper rod, add 1 mL of **Reagent 1** (Sample Buffer) to an SQ-EASY tube.
2. Add 0.5 mL of a 72 h BHI broth with suspected *C. difficile* culture. Cap the tube with a filter tip prior to vortexing.
3. Vortex the tube for 15 sec at high speed. The diluted sample is ready for use.
4. Proceed to Assay Procedure.

Refer to Illustrations, Back Cover**Assay Procedure:**

Open sufficient Test Devices for the number of samples and controls to be tested.

1. Add 3 drops of diluted sample (125 µL) into the Sample Well of a Test Device. Allow sample to absorb for 3 min.

NOTE: On rare occasions, samples that do not pass through the filter tip or samples that filter but do not flow, will require centrifugation at a minimum of 1,500 x g for 10 min. Using a micropipettor, add 125 µL of supernatant to the Sample Well of a new Test Device.

In place of the diluted sample, 2 drops of **Control +** or **Control –** can be added to the Sample Well for quality control.

2. Add 1 drop of **Reagent W** (Wash Reagent) into the Reagent Well and allow to absorb.
3. Add 1 drop of **Reagent 2** (Detector A) into the Reagent Well and wait 3 min.
4. Add 1 drop of **Reagent W** (Wash Reagent) into the Reagent Well and allow to absorb.

NOTE: For strongly reactive samples, a pink test line (positive) may appear in the Test Device window prior to completion of steps 5 and 6.

5. Add 1 drop **Reagent 3** (Detector B) into the Reagent Well and wait 3 min.
6. Add 1 drop **Reagent W** (Wash Reagent) into the Reagent Well and allow to absorb. Read the results after 1 min in a well-lighted area. Color intensity and background may change over time, but results can be interpreted for an additional 10 min.

Quality Control: The liquid **Control +** and **Control –** should be tested when opening each new kit to verify performance of the reagents and test device. Add 2 drops of the **Control +** or **Control –** to the sample well. Allow to absorb for 3 min. Proceed to step 2 under "Assay Procedure".

Optional: Dilution of the **Control +** with **Reagent 1** may be performed and tested to demonstrate a weaker positive reaction as follows:

1. Add 1.5 mL of **Reagent 1** (Sample Buffer) and one free-falling drop of **Control +** to a test tube. Mix gently.
2. Add 1.0 mL of **Reagent 1** (Sample Buffer) to an SQ-EASY tube.
3. Using a transfer pipet, transfer 0.5 mL of diluted **Control +** from the first tube into the SQ-EASY tube.
4. Cap the SQ-EASY tube with a filter tip. Ensure that filter snaps into place.
5. Vortex the tube for 15 sec at high speed. The diluted sample is now ready for use. Proceed to "Assay Procedure".

The **ColorPAC** Toxin A device contains two built-in controls. The appearance of a pink control line in the Assay Window (area "C") provides an internal positive control that validates the immunological reactivity of the device, proper detection reagent function and proper flow characteristics. The membrane area (background) functions as the internal negative control which assures that non-specific color development does not interfere with the test result.

Quality control requirements must be performed in accordance with applicable local, state and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to pertinent CLSI guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

Patient results should not be reported if positive and negative controls do not yield appropriate results.

INTERPRETATION OF RESULTS**Refer to Illustrations, Back Cover**

Positive Test: A result is **positive** if a pink test line of **any intensity** appears in the Assay Window (area "T"). A positive test result indicates that *C. difficile* toxin A has been detected in the patient specimen. A pink control line of any intensity should appear in the Assay Window (area "C"). Some intense positive reactions may cause a reduction in the control line intensity. The background intensity should not obscure the control line.

Negative Test: A result is **negative** if there is no visible test line in the Assay Window (area "T"). A negative test result indicates that *C. difficile* toxin A was not detected in the patient specimen. A pink control line of **any intensity** should

appear in the Assay Window (area "C"). Some patient specimens may cause a dark stained background, resulting in reduced control line intensity.

As with many diagnostic assays performed on stool for *C. difficile* toxin, if the result is negative, and if symptoms persist and *C. difficile*-associated diarrhea is suspected, testing of the same or subsequent stool specimens with a different methodology is recommended.

Uninterpretable Test: The result is **uninterpretable** if there is no pink control line in the Assay Window (area "C"), or if the background obscures reading of the control line.

If the result is uninterpretable, a new sample should be prepared, centrifuged at a minimum 1,500 x g for 10 min, and tested as described in steps 1 through 6 of the "Assay Procedure". If the sample remains uninterpretable, a new specimen should be requested.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The **ColorPAC Toxin A Test** does not define the presence of *C. difficile*-associated disease, but only demonstrates the presence of toxin A in the stool. The level of toxin has not been shown to be correlated with either the presence or absence of patient disease. These test results should be interpreted by a physician in conjunction with other laboratory test results and patient clinical findings.

The diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea (CDAD) should be suspected in any patient with diarrhea who has received antibiotics within the previous 2 months and/or whose diarrhea began 72 h or more after hospitalization.¹¹

Factors such as technical or procedural errors, as well as additional substances present in the stool specimen that are not listed under "Specimen Collection and Handling", may interfere with the test and cause erroneous results.

Some isolates of *Clostridium sordellii* have been shown to produce a hemorrhagic toxin (HT) which has similar biologic, physiochemical and immunochemical properties as toxin A. The HT may cross-react in tests for toxin A.⁴ The *C. sordellii* HT strains have not been detected in patients with antibiotic-associated diarrhea and colitis.

Infants and cystic fibrosis patients may have *C. difficile* toxin present in their stool without clinical significance.^{12,13}

Performance characteristics of the **ColorPAC Toxin A test** have not been established in a pediatric population (<12 yrs.).

Performance studies have not been conducted in a physician's office laboratory or point of care setting.

As with other brands of tests, specimen handling is important for the maintenance of toxin A titers. If testing is delayed more than 72 h, freezing of samples at -70°C is recommended (see "Specimen Collection and Handling").

EXPECTED VALUES

Clostridium difficile is an opportunistic pathogen that exerts its toxigenic effects when the intestinal tract has been compromised in some manner, such as by antibiotic therapy. Therefore, patients with recent antibiotic therapy or those in chronic care situations are most often infected. Estimates indicate up to 15% of healthy adults may have positive stool cytotoxin tests.^{14,15} The prevalence of *C. difficile* infection in diarrhea patients varies with the type of institution, housekeeping practices, and patient population. Prevalence rates ranging from 8.5% to 13.5% in patients suspected of *C. difficile*-associated disease were observed when the **ColorPAC Toxin A test** was evaluated with prospective specimens in clinical trials at four major independent medical centers.¹⁶

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance of the **ColorPAC Toxin A test** was determined in evaluations conducted at four major independent medical centers. The sites were located in geographically diverse areas of the United States. A total of 598 fresh and 162 frozen stool specimens from patients with suspected *C. difficile*-associated disease were tested. Each site compared its routine cytotoxin B assay to the **ColorPAC Toxin A test**. Only 0.1% of stools required centrifugation and repeat testing before obtaining the reportable result. Results of this initial comparison are summarized in Table 1.

Table 1
Comparison of ColorPAC Toxin A Results versus Cytotoxin B Results

Site	No.	ColorPAC Toxin A	Cytotoxin B Results		95% Confidence Intervals
			Positive	Negative	
1	240	Positive	028	006	Sensitivity 82% (65.5%,93.2%) Specificity 97% (93.8%,98.9%)
		Negative	006	200	
2	135	Positive	018	001	Sensitivity 90% (68.3%,98.8%) Specificity 99% (95.3%,99.9%)
		Negative	002	114	
3	207	Positive	021	011	Sensitivity 81% (60.7%,93.5%) Specificity 94% (89.4%,96.9%)
		Negative	005	170	
4	178	Positive	029	001	Sensitivity 74% (57.9%,87.0%) Specificity 99% (96.1%,100%)
		Negative	010	138	
Combined	760	Positive	096	019	Sensitivity 81% (72.4%,87.3%) Specificity 97% (95.4%,98.2%)
		Negative	023	622	

Due to the lack of standardization of cytotoxin assays, discordant specimens were further investigated with toxigenic culture. Comparison of **ColorPAC Toxin A test** discordant results with toxigenic culture is summarized in Table 2.

Table 2
Comparison of ColorPAC Toxin A Results versus Cytotoxin B
Results with Resolution of Nonconcordant Specimens

Site	No.	ColorPAC Toxin A	Cytotoxin B Results	
			Positive	Negative
1	240	Positive	030	004
		Negative	005	201
2	135	Positive	018	001
		Negative	000	116
3	207	Positive	022	010
		Negative	000	175
4	178	Positive	029	001
		Negative	007	141
Combined	760	Positive	099	016
		Negative	012	633

As indicated in "Expected Values", prevalence rates ranged from 8.5% to 13.5% in patients suspected of *C.difficile*-associated disease when the ColorPAC Toxin A test was evaluated with prospective specimens in clinical trials at four major independent medical centers. The positive and negative predictive values (PPV, NPV) for each site are shown in Table 3 based on actual prevalence and performance characteristics at each of the clinical sites.

Table 3
ColorPAC Toxin A – Positive and Negative Predictive Values
Based on Actual Prevalence and Performance Characteristics

Site	Sensitivity	Specificity	Prevalence	PPV	NPV
1	82%	97%	8.5%	72%	98%
2	90%	99%	13.5%	93%	98%
3	81%	94%	10.2%	61%	98%
4	74%	99%	11.1%	90%	97%

The ColorPAC Toxin A test was also compared to three Enzyme Immunoassays (EIA). Each of the four clinical trial sites tested at least one EIA, ColorPAC Toxin A and cytotoxin B for each sample. Results of each toxin A assay are compared to cytotoxin B and summarized in Table 4.

Table 4
Combined Site Comparison of Toxin A Assays versus Cytotoxin B

Performance	ColorPAC Toxin A	EIA Method 1	EIA Method 2	EIA Method 3
Sensitivity	81%	80%	74%	86%
Specificity	97%	97%	98%	98%
Agreement	95%	94%	94%	96%
% Initial Uninterpretable or Indeterminate	0.1%	0.9%	2.4%	0%

Colony Confirmation

A study was conducted to evaluate the ColorPAC Toxin A test performance for providing culture confirmation from suspected colony growth for toxin producing strains of *C. difficile* using selective agar, anaerobic blood agar, and Brain Heart Infusion (BHI) broth. A total of 111 clinical isolates that met morphological characteristics of *C. difficile* were tested from each medium using the ColorPAC Toxin A test. After identification of the colonies by biochemical methods, toxigenic status was determined by a cytotoxin B assay. Results from this initial comparison are summarized in Table 5.

Table 5
Comparison of ColorPAC Toxin A Results versus Cytotoxin B - Colony Confirmation by Media Type (Initial Testing)

Media Type	No. Specimens	Sensitivity		Specificity	
		95% Confidence Intervals	95% Confidence Intervals	95% Confidence Intervals	95% Confidence Intervals
BHI Broth	111	52/55	95% (84.9%, 98.8%)	52/56	93% (82.7%, 98.0%)
Selective Agar	111	52/55	95% (84.9%, 98.8%)	52/56	93% (82.7%, 98.0%)
Anaerobic Blood Agar	111	49/55	89% (77.7%, 95.9%)	53/56	95% (85.1%, 98.9%)

Discordant results were further investigated by testing colonies for Toxin A production using a Toxin A EIA method. Comparison of ColorPAC Toxin A test discordant results to cytotoxin B and a Toxin A method are summarized in Table 6.

Table 6
Comparison of ColorPAC Toxin A Results versus Cytotoxin B - Colony Confirmation by Media Type (with Resolution)

Media Type	No. Specimens	Sensitivity	Specificity
BHI Broth	111	55/55	55/56
Selective Agar	111	55/55	55/56
Anaerobic Blood Agar	111	52/55	56/56

Cross Reactivity: The ColorPAC Toxin A test was evaluated for cross reactivity by seeding microorganisms (i.e., bacteria, yeast, viruses, and parasites) into toxin A positive and toxin A negative stool specimens to a final concentration of $10^7 - 10^8$ CFU/mL for bacteria and yeast, $10^{3.2} - 10^{6.2}$ TCID₅₀/mL for viruses, and 10^6 parasites/mL. As expected, the only organism shown to cross react in the test is a highly toxigenic isolate of *Clostridium sordellii* (VPI 9048). This isolate elaborates high levels of hemorrhagic and lethal toxins which have been shown to be immunologically and biologically similar to *C. difficile* toxin A and B. The *Staphylococcus aureus* Cowan strain ATCC™ 12598, which produces protein A, did not show cross reactivity. Also, *Escherichia coli* ATCC 43889, 43894, and 43895 which produce Shiga-like toxins (SLT) did not show any cross reactivity. The following microorganisms did not give false positive results in toxin A negative stool or false negative results in toxin A positive stools.

Microorganisms (# Strains tested)		
<i>Adenovirus</i> , types 2, 40, 41 (3)	<i>Clostridium perfringens</i> (1)	<i>Giardia intestinalis</i> (1)
<i>Aeromonas hydrophilia</i> (1)	<i>Clostridium septicum</i> (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)
<i>Bacillus cereus</i> (1)	<i>Clostridium sordellii</i> , VPI 9048 (1)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1)
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	<i>Clostridium sporogenes</i> (1)	<i>Proteus mirabilis</i> (1)
<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	<i>Clostridium subterminale</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)
<i>Campylobacter coli</i> (1)	<i>Clostridium tetani</i> (1)	<i>Rotavirus</i> , human (1)
<i>Campylobacter fetus</i> (1)	<i>Coxsackie virus</i> , B1 (1)	<i>Salmonella choleraesuis</i> (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	<i>Cytomegalovirus</i> (1)	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
<i>Campylobacter laridis</i> (1)	<i>Echovirus</i> , type 22 (1)	<i>Shigella flexneri</i> (1)
<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Entamoeba histolytica</i> (1)	<i>Shigella sonnei</i> (1)
<i>Clostridium botulinum</i> , type A (1)	<i>Enterococcus faecalis</i> , ATCC 29212 (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 12598 (Cowan) (1)
<i>Clostridium butyricum</i> (1)	<i>Enterococcus faecium</i> , ATCC 51559 (Vancomycin resistant) (1)	<i>Vibrio cholerae</i> (1)
<i>Clostridium histolyticum</i> (1)	<i>Enterovirus</i> , type 69 (1)	<i>Vibrio parahemolyticus</i> (1)
<i>Clostridium innocuum</i> (1)	<i>Escherichia coli</i> (4)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)
<i>Clostridium novyi</i> (1)		

Limit of Detection

The analytical sensitivity of ColorPAC Toxin A test was performed by seeding known concentrations of toxin A into five specimens each of liquid, semi-solid and solid stools. Seeded specimens were tested in triplicate. Results are summarized in Table 7.

Table 7
Limit of Detection by Stool Type

Toxin A Seeded Matrix	LOD Range (ng/mL)
Liquid Stool	1.38 – 5.21
Semi-Solid Stool	1.61 – 18.71
Solid Stool	3.19 – 22.58

Assay Reproducibility

Reproducibility of the ColorPAC Toxin A test was evaluated at several clinical laboratories by testing stool panels consisting of three levels of toxin A and a toxin A negative antigen control. Blinded specimens were tested in triplicate on each of three days at each of four different clinical trial sites. ColorPAC Toxin A demonstrated 100% intra and inter assay reproducibility.

AVAILABILITY

Cat. No.	Description
274030	ColorPAC™ Toxin A, <i>C. difficile</i> , 30 Test Kit.

REFERENCES

- Sullivan, N.M., S. Pellet, and T.D. Wilkins. 1982. Purification and characterization of toxin A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 35:1032-1040.
- 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.
- Bartlett, J.G. 1994. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and current state of knowledge about the organism. *Clin. Infect. Dis.* 18: (Suppl. 4): S265-S272.
- Lyerly, D.M., H.C. Krivan, and T.D. Wilkins. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 1-18.
- Baron, E.J. 1989. Assessment of currently-available laboratory tests for *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin. Microbiol. Newsl.* 11:118-120.

6. Merz, C.S., C. Kramer, M. Forman, L. Gluck, K. Mills, K. Senft, I. Steiman, N. Wallace, and P. Charache. 1994. Comparison of four commercially available rapid enzyme immunoassays with cytotoxin assay for detection of *Clostridium difficile* toxin(s) from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 32:1142-1147.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
8. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 17:53-80.
9. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
10. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of article 16(1) of Directive 89/391/EEC). *Official Journal L262*, 17/10/2000, p. 0021-0045.
11. Gerding, D.N., Johnson, S. 1998. *Clostridium difficile* - associated diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 26:1027-1036.
12. Cooperstock, M. 1988. *Clostridium difficile* in infants and children, p. 45-64. In R.O. Rolfe, and S.M. Finegold (ed.), *Clostridium difficile: its role in intestinal disease*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
13. Peach, S.L., S.P. Borriello, H. Gayla, F.E. Barclay, and A.R. Welch. 1986. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Pathol.* 39:1013-1018.
14. Schlepner, M.A., D.C. Garner, K.M. Sosnowski, C.J. Schlepner, L.J. Barrett, E. Silva, D. Hirsch, and R.L. Guerrant. 1995. Concurrence of *Clostridium difficile* toxin A enzyme-linked immunosorbent assay, fecal lactoferrin assay, and clinical criteria with *Clostridium difficile* cytotoxin titer in two patient cohorts. *J. Clin. Microbiol.* 33:1755-1759.
15. Gerding, D. N., S. Johnson, L.R. Peterson, M.E. Mulligan, and J. Silva, Jr. 1995. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 16:459-477.
16. Data on file, BD Diagnostic Systems.

BD ColorPAC Toxin A

Français

APPLICATION

ColorPAC Toxin A Test est une méthode chromatographique rapide de détection qualitative de la toxine A *Clostridium difficile* (entérotoxine) dans des échantillons de selles de patients supposés atteints de maladie associée à *C. difficile*. Le test peut aussi servir à confirmer l'identité de colonies suspectées d'être des *C. difficile* toxigènes sur des cultures sur géloses en boîtes de Pétri ou sur bouillon BHI. Cette méthode a été conçue pour aider au diagnostic de la maladie associée à *C. difficile*.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

C. difficile est un agent causal important de la diarrhée associée aux traitements antibiotiques, qui, sous sa forme la plus sévère, peut résulter dans le syndrome clinique de colite pseudomembraneuse avec une mortalité importante. Bien que *C. difficile* puisse appartenir à la flore bactérienne intestinale normale, il peut se transformer en un pathogène opportuniste à la suite d'un traitement du patient avec des antibiotiques et de l'altération subséquente de la flore intestinale normale. Dans les conditions appropriées, les souches de *C. difficile* productrices de toxines produisent deux toxines : la toxine A, une entérotoxine qui attaque les tissus, et la toxine B, une cytotoxine in vitro.¹ Les références bibliographiques indiquent que les deux toxines, A et B, sont produites en même temps.² Les symptômes cliniques associés à la maladie sont considérés comme étant essentiellement dus à la toxine A, et il n'y a pas à ce jour de preuve convaincante que la toxine B ait un rôle biologique important dans la maladie d'origine naturelle.³

Les aides cliniques les plus courantes pour le diagnostic de la colite à *C. difficile* associée au traitement par des antibiotiques ont été des essais de cytotoxicité sur cultures cellulaires (CTA), des essais d'agglutination au latex (LA) et des essais immunoenzymatiques (EIA).⁴ Les essais CTA décèlent la toxine B grâce à son effet cytopathique sur les cultures cellulaires et demandent un à deux jours pour être accomplis. L'agglutination au latex met en évidence les antigènes de *C. difficile* plutôt que ses toxines spécifiques, mais elle considérée comme un moyen rapide et efficace permettant d'établir si *C. difficile* a un rôle étiologique chez des patients atteints de diarrhée.⁵ Les tests immunoenzymatiques sur micropuits peuvent déceler la toxine A et, dans certains cas, la toxine A et la toxine B simultanément.⁶

PRINCIPES DE LA METHODE

ColorPAC Toxin A Test comprend un anticorps de fixation de la toxine A de *C. difficile* immobilisé sur une bande chromatographique contenue dans un dispositif de test. Un échantillon (par exemple, selles, colonies, ou bouillon BHI) est dilué avec le tampon pour échantillon, puis versé dans le puits à échantillon du dispositif de test. L'échantillon dilué imbibe la bande chromatographique par capillarité. La toxine A, si elle est présente, se lie à l'anticorps immobilisé au niveau du front du test à mesure que l'échantillon diffuse dans la bande chromatographique. La solution de lavage et les autres réactifs sont apportés dans le puits des réactifs du dispositif de test.

Après l'ajout du détecteur A, les liposomes recouverts de l'anticorps de la toxine A et contenant un colorant rose diffusent dans la bande chromatographique et se lient à l'antigène, la toxine A de *C. difficile*, qui s'était fixé à la bande chromatographique pendant l'étape précédente. L'apparition de la coloration est facilitée par l'apport d'un second réactif à liposomes, le détecteur B, qui se lie au complexe formé par le détecteur A et l'antigène de l'échantillon fixé au front du test. Après le dernier lavage, les réactions sont lues visuellement. Si l'antigène, la toxine A, est mis en évidence dans l'échantillon, un front rose pour le test et une ligne rose de contrôle apparaissent, indiquant que le test est positif. Si la toxine est absente, seule la ligne rose de contrôle apparaît, signalant un résultat négatif.

REACTIFS :

ColorPAC Toxin A Test Kit :

Réactif 1 (30,0 mL) Tampon pour échantillon : sérum physiologique tamponné avec un agent mucolytique, 1 % de détergent.

Réactif 2 (1,5 mL) Détecteur A : liposomes recouverts d'anticorps de lapin de la toxine A de *C. difficile*.

Réactif 3 (1,5 mL) Détecteur B : liposomes recouverts d'anticorps de lapin spécifiques du détecteur A.

Réactif W (2,3 mL) Solution de lavage : solution de sérum physiologique tamponnée contenant un stabilisateur protéique bovin, 0,1 % de détergent.

Contrôle + (1,0 mL) Contrôle positif : solution de sérum physiologique tamponnée contenant un stabilisateur protéique bovin et de la toxine A de *C. difficile* inactivée.

Contrôle - (1,0 mL) Contrôle négatif : solution de sérum physiologique tamponnée contenant un stabilisateur protéique bovin.

Les réactifs et les contrôles contiennent tous 0,2 % d'azide de sodium (agent conservateur).

30 dispositifs de test Chacun contenant une bande de test recouverte d'anticorps monoclonaux de la toxine A de *C. difficile*, et de toxine A de *C. difficile*.

30 tubes et embouts à filtre SQ-EASY.

30 bâtons d'application et 30 pipettes de transfert.

1 bâton compte-gouttes

Avertissements et Précautions :

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Réactifs : Dès réception, mettre au réfrigérateur ou sortir du carton les réactifs qui ont besoin d'être réfrigérés et conserver à 2 – 8 °C. NE PAS CONGELER. Les remettre immédiatement au réfrigérateur après usage, en veillant à ne pas permuter les bouchons à code de couleur. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption. Après avoir sorti les réactifs du réfrigérateur, les laisser se réchauffer à température ambiante avant de les utiliser. Eviter toute exposition prolongée des réactifs à une forte lumière.

Ne pas échanger, mélanger ou combiner les réactifs ou les dispositifs provenant de lots de coffrets différents.

Pour garantir une distribution en gouttes correcte, maintenir le flacon distributeur de réactif verticalement, de manière à ne distribuer qu'une goutte à la fois.

Avertissement : Les réactifs contiennent de l'azide de sodium, très toxique par inhalation, au contact avec la peau et en cas d'ingestion. Au contact d'un acide, un gaz très toxique est dégagé. Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec beaucoup d'eau. L'azide de sodium peut réagir au contact du plomb ou du cuivre des canalisations et former des azides métalliques très explosifs. Lors de l'élimination, faire couler un volume d'eau important pour éviter l'accumulation d'azides.

Dispositifs de test : Ne sortir le dispositif de test de sa pochette que juste avant l'utilisation. Conserver les dispositifs non ouverts à température ambiante (15 – 30 °C) ou au réfrigérateur (2 – 8 °C) si désiré. Ne pas soumettre les dispositifs non utilisés à des cycles répétés alternant température ambiante et réfrigération. A usage unique ; ne pas réutiliser.

Contrôles : Ne pas utiliser le coffret si les contrôles positif et négatif ne donnent pas les résultats appropriés. Le contrôle positif contient de la toxine A inactivée de *C. difficile* et doit être manipulé comme du matériel potentiellement infectieux.

Pipettes de transfert : A usage unique ; ne pas réutiliser.

Embouts à filtre : L'embout doit contenir du matériel de filtration blanc pour assurer une performance adéquate du test. A usage unique ; ne pas réutiliser. S'assurer que l'embout à filtre est bien en place, de façon que le bord supérieur de l'embout à filtre arase le sommet du tube SQ-EASY.

Avertissement : Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et le virus d'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les « Précautions standard »⁷⁻¹⁰ et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques.

Jeter tout le matériel ayant servi à la réalisation du test dans un récipient agréé pour les déchets présentant un risque biologique. Les échantillons peuvent être passés à l'autoclave pendant 60 min à 121 °C ou traités avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,05 % (dilution au 1/100 d'une solution d'eau de Javel commerciale) pendant 30 min. Ne jamais passer à l'autoclave du matériel contenant de l'hypochlorite de sodium.

PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Prélever les échantillons de selles dans un récipient propre hermétique à l'air, ne contenant pas d'agent conservateur. L'analyse des échantillons doit être effectuée aussi tôt que possible après réception au laboratoire ; mais la conservation au réfrigérateur jusqu'à 72 h à 2 – 8 °C est permise. Si les échantillons ne peuvent pas être analysés dans les 72 h, ils doivent être congelés à -70 °C immédiatement après réception au laboratoire. Les échantillons peuvent

être conservés congelés pendant 2 mois maximum. Les échantillons positifs présenteront peu ou pas de réduction de la mise en évidence de la toxine A par le test **ColorPAC Toxin A** après trois cycles de congélation-décongélation.

Laisser les échantillons de selles se réchauffer à température ambiante et les mélanger aussi complètement que possible avant de les utiliser.

Les résultats du test **ColorPAC Toxin A** ne sont pas affectés par l'ampicilline, la céfalexine, le métronidazole, la vancomycine, le sulfate de baryum, les laxatifs, le sang et les médicaments anti-diarrhée qui peuvent être présents dans les selles.

Il est conseillé d'effectuer les tests d'identification de *C. difficile* ou de ses toxines sur des échantillons de selles diarrhéiques (non formés).⁷

MODE OPERATOIRE

Matériel fourni : Tout le matériel est énuméré dans la rubrique « Réactifs ».

Matériels requis mais non fourni : Agitateur type vortex et compte-minutes, dispositif de micropipetage ; optionnel : bouillon coeur-cervelle ou gélose sélective de *C. difficile* requis seulement pour la détection de la toxine A dans les isolats de culture de *C. difficile*, centrifugeuse capable de centrifuger à 1500 x g – voir Méthode de test, point 1.

Performance du test : Relire les paragraphes « Précautions » et « Prélèvement et manipulation des échantillons » avant de procéder au test. Le plan de travail, les réactifs, les échantillons à tester et les composants du test doivent tous être à température ambiante avant de procéder au test.

Mélanger doucement tous les réactifs en les inversant plusieurs fois avant de les utiliser. Eviter de faire mousser.

PREPARATION DES ECHANTILLONS DE SELLES – se reporter aux illustrations au dos de la couverture

1. Avec un dispositif de micropipetage ou le bâton compte-gouttes fourni, verser 1 mL de **Réactif 1** (tampon pour l'échantillon) dans un tube SQ-EASY par échantillon devant être testé.
2. Mélanger l'échantillon de selles aussi complètement que possible. Pour des selles liquides ou semi-liquides, pipeter 0,5 mL d'échantillon dans un tube contenant le **Réactif 1** au moyen de la pipette de transfert fournie. Pour des selles solides, utiliser une des spatules en bois ou un des applicateurs fournis pour prélever deux fragments de la taille d'un petit pois (0,5 g) en deux endroits différents de l'échantillon et les transférer dans le tube contenant le **Réactif 1**. Boucher le tube avec un embout à filtre avant de le passer au vortex.
3. Agiter le tube au vortex pendant 15 sec à très grande vitesse. L'échantillon dilué est prêt pour le test. Appliquer la méthode de test.

PREPARATION DES ECHANTILLONS SUR BOUILLON BHI ET DES COLONIES – (facultatif)

Test de la toxine A sur cultures sur géloses en boîte de Pétri :

1. Repérer les colonies suspectes sur la surface gélosée de cultures âgées de 42 à 48 h présentant les caractéristiques morphologiques et de coloration de Gram de *C. difficile*.
2. Avec un dispositif de micropipetage ou le bâton compte-gouttes fourni, verser 1 mL of **Réactif 1** (tampon pour échantillon) dans un tube de culture 12 x 75 mm. Transférer aseptiquement suffisamment de colonies suspectes isolées pour obtenir une turbidité équivalente au standard 2,0 de McFarland.
3. Comparer visuellement la suspension bactérienne au standard 2,0 de McFarland. Ajouter au besoin du **Réactif 1** pour obtenir une turbidité équivalente au standard 2,0 de McFarland.
4. Agiter le tube au vortex pendant 15 sec à très grande vitesse. L'échantillon dilué est prêt pour le test.
5. Appliquer la méthode de test.

Test de la toxine A sur bouillon BHI :

1. Avec un dispositif de micropipetage ou le bâton compte-gouttes fourni, verser 1 mL of **Réactif 1** (tampon pour échantillon) dans un tube SQ-EASY.
2. Ajouter 0,5 mL d'une culture de 72 h sur bouillon BHI suspectée contenir *C. difficile*. Boucher le tube avec un embout à filtre avant de le passer au vortex.
3. Agiter le tube au vortex pendant 15 sec à très grande vitesse. L'échantillon dilué est prêt pour le test.
4. Appliquer la méthode de test.

Se reporter aux illustrations au dos de la couverture

Méthode de test :

Déballer suffisamment de dispositifs de test pour le nombre d'échantillons et de contrôles à tester.

1. Ajouter 3 gouttes de l'échantillon dilué (125 µL) dans le puits pour échantillon d'un dispositif de test. Laisser l'échantillon s'absorber pendant 3 min.

REMARQUE : En de rares occasions, les échantillons qui ne peuvent passer à travers l'embout à filtre ou les échantillons qui le peuvent, mais ne coulent pas, auront besoin d'être centrifugés à un minimum de 1500 x g pendant 10 min. Au moyen d'un dispositif de micropipetage, ajouter 125 µL de surnageant dans le puits pour l'échantillon d'un dispositif de test neuf.

A la place de l'échantillon dilué, ajouter 2 gouttes du **Contrôle +** ou du **Contrôle –** dans le puits pour l'échantillon pour le contrôle de qualité.

2. Ajouter 1 goutte de **Réactif W** (solution de lavage) dans le puits pour réactifs et la laisser s'absorber.
3. Ajouter 1 goutte de **Réactif 2** (détecteur A) dans le puits pour réactifs et attendre 3 min.

4. Ajouter 1 goutte de **Réactif W** (solution de lavage) dans le puits pour réactifs et la laisser s'absorber.
REMARQUE : Pour des échantillons réagissant fortement, un front rose de test (positif) peut apparaître dans la fenêtre du dispositif de test avant que les étapes 5 et 6 ne soient accomplies.
5. Ajouter 1 goutte de **Réactif 3** (détecteur B) dans le puits pour réactifs et attendre 3 min.
6. Ajouter 1 goutte de **Réactif W** (solution de lavage) dans le puits pour réactifs et la laisser s'absorber. Lire les résultats 1 min plus tard dans une zone bien éclairée. L'intensité de la coloration et la coloration du fond peuvent changer au cours du temps, mais les résultats restent interprétables pendant 10 min de plus.

Contrôle de qualité : Les solutions de **Contrôle +** et **Contrôle -** doivent être testées à chaque fois qu'un nouveau coffret est mis en service pour vérifier la performance des réactifs et du dispositif de test. Ajouter 2 gouttes du **Contrôle +** ou du **Contrôle -** dans le puits pour échantillons. Laisser absorber pendant 3 min. Appliquer l'étape 2 de la « Méthode de test ».

Facultatif : Le **Contrôle +** peut être diluée avec du **Réactif 1** et cette dilution testée afin de donner un exemple de réaction positive plus faible comme suit :

1. Ajouter 1,5 mL de **Réactif 1** (tampon pour l'échantillon) et une goutte de **Contrôle +** dans un tube à essai. Mélanger doucement.
2. Ajouter 1,0 mL de **Réactif 1** (tampon pour l'échantillon) dans un tube SQ-EASY.
3. Au moyen d'une pipette de transfert, transférer 0,5 mL of de la dilution du **Contrôle +** du premier tube dans le tube SQ-EASY.
4. Boucher le tube SQ-EASY avec un embout à filtre. S'assurer que le filtre est bien en place.
5. Agiter le tube au vortex pendant 15 sec à très grande vitesse. L'échantillon dilué est maintenant prêt pour le test. Appliquer la « Méthode de test ».

Le dispositif **ColorPAC Toxin A** contient deux contrôles internes. L'apparition d'une ligne rose de **Contrôle** dans le fenêtre du dispositif (zone « C ») constitue un **Contrôle interne positif** qui valide la réactivité immunologique du test, le fonctionnement adéquat des réactifs de détection et l'existence de conditions de débit adéquates. La membrane (fond) sert de **Contrôle négatif interne** garantissant que les résultats du test ne sont pas affectés par l'apparition d'une coloration non spécifique.

Effectuer les contrôles de qualité conformément à la réglementation nationale et/ou internationale, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives CLSI et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

Les résultats pour les patients ne doivent pas être retenus si le contrôle positif ou le contrôle négatif ne donne pas les résultats appropriés.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Se reporter aux illustrations au dos de la couverture

Test positif : Un résultat est **positif** si un front rose de **n'importe quelle intensité** apparaît dans la fenêtre du dispositif (zone « T »). Un tel résultat positif signifie que la toxine A de *C. difficile* a été mise en évidence dans l'échantillon prélevé sur le patient. Une ligne rose de contrôle de **n'importe quelle intensité** doit apparaître dans la fenêtre du dispositif (zone « C »). Certaines réactions positives très intenses peuvent entraîner une réduction de l'intensité de la coloration de la ligne de contrôle. L'intensité de la coloration du fond ne doit pas masquer celle de la ligne de contrôle.

Test négatif : Un résultat est **négatif** s'il n'apparaît aucun front rose visible dans la fenêtre du dispositif (zone « T »). Un tel résultat négatif signifie que la toxine A de *C. difficile* n'a pas été décelée dans l'échantillon prélevé sur le patient. Une ligne rose de contrôle de **n'importe quelle intensité** doit apparaître dans la fenêtre du dispositif (zone « C »). Certains échantillons de patients peuvent entraîner une coloration foncée du fond d'où une intensité réduite de la ligne de contrôle.

Comme avec de nombreux tests de diagnostic effectués sur des selles à la recherche de la toxine de *C. difficile*, si le résultat est négatif et si les symptômes persistent et que l'on continue à suspecter une diarrhée associée à *C. difficile*, il est recommandé de tester le même échantillon de selles ou des échantillons subséquents selon une technique différente.

Résultats ininterprétables : Le résultat est **ininterprétable** si aucune ligne rose de contrôle n'apparaît dans la fenêtre du dispositif (zone « C ») ou si le fond masque la lecture de la ligne de contrôle.

Si le résultat est ininterprétable, un nouvel échantillon doit être préparé, centrifugé à un minimum de 1500 x g pendant 10 min, et testé conformément aux étapes 1 à 6 incluse de la « Méthode de test ». Si les résultats pour l'échantillon demeurent ininterprétables, un nouvel échantillon doit être demandé au patient.

LIMITES DE LA METHODE

Le test **ColorPAC Toxin A** ne diagnostique pas la présence de maladie associée à *C. difficile*, il met seulement en évidence la présence de la toxine A dans les selles. La concentration en toxine n'a été corrélée ni avec la présence, ni avec l'absence de la maladie chez le patient. Les résultats de ce test doivent donc être interprétés par un médecin en conjonction avec les résultats d'autres analyses de laboratoire et les observations cliniques du patient.

Le diagnostic de diarrhée associée à *C. difficile* (CDAD) doit être considéré pour tout patient atteint de diarrhée qui a suivi un traitement antibiotique dans le cours des 2 mois précédents et/ou dont la diarrhée survient dans les 72 h ou plus suivant l'hospitalisation.¹¹

Des facteurs tels que des erreurs techniques ou opératoires, ainsi que des substances autres que celles énumérées dans la rubrique « Prélèvement et manipulation des échantillons » présentes dans les selles peuvent affecter le test et causer des résultats erronés.

Certains isolats de *Clostridium sordellii* peuvent produire une toxine hémorragique (HT) qui a des propriétés biologiques, physicochimiques et immunochimiques similaires à celles de la toxine A. La HT peut donner une réaction croisée avec les tests pour la toxine A.⁴ Les souches de *C. sordellii* productrices de HT n'ont pas été isolées chez des patients souffrant de colite et de diarrhée associées à un traitement antibiotique.

Les nouveaux-nés et les patients atteints de mucoviscidose peuvent présenter de la toxine de *C. difficile* dans leurs selles sans que cela ait aucune signification clinique.^{12,13}

Les caractéristiques de performance du test **ColorPAC Toxin A** n'ont pas été établies pour les enfants (< 12 ans).

La performance n'a pas été étudiée dans le contexte d'un laboratoire de cabinet médical ou d'un centre de soins.

Comme avec les autres tests commerciaux, la préparation de l'échantillon est importante pour le maintien des titres en toxine A. Si le test est retardé de plus de 72 h, la congélation des échantillons à -70 °C est recommandée (voir « Prélèvement et manipulation des échantillons »).

VALEURS ATTENDUES

Clostridium difficile est un pathogène opportuniste qui exerce ses effets toxiques quand le tube digestif a été endommagé d'une manière quelconque, par exemple un traitement antibiotique. C'est pourquoi les patients ayant récemment reçu un traitement antibiotique et ceux atteints de maladies chroniques exigeant des soins constants sont les plus souvent infectés. Il a été estimé que jusqu'à 15 % des adultes en bonne santé peuvent présenter des selles donnant des résultats positifs pour les tests de cytotoxines.^{14,15} L'incidence de l'infection à *C. difficile* chez les patients atteints de diarrhée varie avec le type d'établissement, les pratiques sanitaires et la population de patients. Des taux d'incidence variant de 8,5 % à 13,5 % ont été observés chez des patients suspectés de souffrir de diarrhée associée à *C. difficile* lorsque le test **ColorPAC Toxin A** a été testé sur des échantillons prospectifs aux cours d'essais cliniques dans quatre grands centres médicaux indépendants.¹⁶

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

La performance du test **ColorPAC Toxin A** a été déterminée au cours d'évaluations effectuées dans quatre grands centres médicaux indépendants. Les sites étaient situés dans différentes régions géographiques des Etats-Unis. Un total de 598 échantillons frais et 162 échantillons congelés de selles de patients suspectés d'être atteints de maladie associée à *C. difficile* a été testé. Chaque site a comparé son test habituel de détection de la cytotoxine B au test **ColorPAC Toxin A**. Seulement 0,1 % des selles ont nécessité une centrifugation et une répétition du test avant de donner un résultat interprétable. Les résultats de cette première comparaison sont donnés dans le tableau 1.

Tableau 1

Comparaison des résultats des tests **ColorPAC Toxin A** et Cytotoxine B

Site	No	ColorPAC Toxin A	Résultats de cytotoxine B		Intervalles de confiance à 95 %
			Positif	Négatif	
1	240	Positif	028	006	Sensibilité 82 % (65,5 %,93,2 %)
		Négatif	006	200	
2	135	Positif	018	001	Sensibilité 90 % (68,3 %,98,8 %)
		Négatif	002	114	
3	207	Positif	021	011	Sensibilité 81 % (60,7 %,93,5 %)
		Négatif	005	170	
4	178	Positif	029	001	Sensibilité 74 % (57,9 %,87,0 %)
		Négatif	010	138	
Combiné	760	Positif	096	019	Sensibilité 81 % (72,4 %,87,3 %)
		Négatif	023	622	

En raison du manque de standardisation des tests de détection des cytotoxines, les échantillons donnant des résultats contradictoires ont été analysés à la lumière de la culture toxigène. La comparaison des résultats du test **ColorPAC Toxin A** en contradiction avec ceux de la culture toxigène est récapitulée dans le tableau 2.

Tableau 2

Comparaison des résultats des tests **ColorPAC Toxin A** et Cytotoxine B avec résolution des échantillons non concordants

Site	No	ColorPAC Toxin A	Résultats de Cytotoxine B	
			Positif	Négatif
1	240	Positif	030	004
		Négatif	005	201
2	135	Positif	018	001
		Négatif	000	116
3	207	Positif	022	010
		Négatif	000	175
4	178	Positif	029	001
		Négatif	007	141
Combiné	760	Positif	099	016
		Négatif	012	633

Comme indiqué dans la rubrique « Valeurs attendues », les taux d'incidence variaient de 8,5 % à 13,5 % chez les patients suspectés d'être atteints de maladie associée à *C. difficile* lorsque le test **ColorPAC Toxin A** était appliqué à des échantillons prospectifs lors d'essais cliniques dans quatre grands centres médicaux indépendants. Les valeurs positives et négatives de prédiction (PPV, NPV) pour chaque site sont données dans le tableau 3 sur la base de l'incidence réelle et des caractéristiques de performance sur chacun des sites cliniques.

Tableau 3

ColorPAC Toxin A – Valeurs positives et négatives de prédiction sur la base de l'incidence réelle et des caractéristiques de performance

Site	Sensibilité	Spécificité	Incidence	PPV	NPV
1	82 %	97 %	8,5 %	72 %	98 %
2	90 %	99 %	13,5 %	93 %	98 %
3	81 %	94 %	10,2 %	61 %	98 %
4	74 %	99 %	11,1 %	90 %	97 %

Le test **ColorPAC Toxin A** a aussi été comparé à trois méthodes d'essais immunoenzymatiques (EIA). Chacun des quatre sites cliniques a appliqué au minimum un essai EIA, le test **ColorPAC Toxin A** et un test de la cytotoxine B à chaque échantillon. Les résultats de chacun des tests de la toxine A ont été comparés à ceux des tests de la cytotoxine B ; ils sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4

Comparaison des sites combinés des tests Toxin A et Cytotoxine B

Performances	ColorPAC Toxin A	Méthode EIA 1	Méthode EIA 2	Méthode EIA 3
Sensibilité	81 %	80 %	74 %	86 %
Spécificité	97 %	97 %	98 %	98 %
Corrélation	95 %	94 %	94 %	96 %
% Initial non interprétable ou indéterminé	0,1 %	0,9 %	2,4 %	0 %

Confirmation au niveau des colonies

Une étude a été effectuée afin d'évaluer la performance du test **ColorPAC Toxin A** comme moyen de confirmer par la culture à partir de colonies suspectes l'identité des souches productrices de toxine de *C. difficile* en utilisant des géloses sélectives, des géloses au sang anaérobies et du bouillon cœur-cerveille (BHI). Un total de 111 isolats cliniques qui présentaient les caractéristiques morphologiques de *C. difficile* ont été testés pour chaque milieu de culture au moyen du test **ColorPAC Toxin A**. Après l'identification des colonies au moyen de méthodes biochimiques, le caractère toxigène a été déterminé par un test de la cytotoxine B. Les résultats de cette première étude sont donnés dans le tableau 5.

Tableau 5

Comparaison des résultats de tests ColorPAC Toxin A et Cytotoxine B – Confirmation des colonies en fonction du type de milieu (tests initiaux)

Type de milieu	Nb d'échantillons	Intervalles de confiance à 95 % de sensibilité		Intervalles de confiance à 95 % de spécificité	
Bouillon BHI	111	52/55	95 % (84,9 %, 98,8 %)	52/56	93 % (82,7 %, 98,0 %)
Géloses sélectives	111	52/55	95 % (84,9 %, 98,8 %)	52/56	93 % (82,7 %, 98,0 %)
Géloses au sang anaérobie	111	49/55	89 % (77,7 %, 95,9 %)	53/56	95 % (85,1 %, 98,9 %)

Un examen plus approfondi des résultats contradictoires a été réalisé en testant la production de toxine A par les colonies au moyen d'une méthode d'EIA. La comparaison des résultats contradictoires entre le test **ColorPAC Toxin A** et les tests cytotoxine B et Toxin A est donnée dans le tableau 6.

Tableau 6

Comparaison des résultats de tests ColorPAC Toxin A et cytotoxine B – Confirmation des colonies en fonction du type de milieu (avec résolution)

Type de milieu	Nb d'échantillons	Sensibilité	Spécificité
Bouillon BHI	111	55/55	55/56
Géloses sélectives	111	55/55	55/56
Géloses au sang anaérobie	111	52/55	56/56

Réactivité croisée : Le test ColorPAC Toxin A a été évalué pour la réactivité croisée grâce à l'ensemencement de microorganismes (c.-à-d. bactéries, levures, virus et parasites) dans des échantillons de selles positives à la toxine A et négatives à la toxine A jusqu'à une concentration finale de $10^7 - 10^8$ CFU/mL pour les bactéries et les levures, de $10^{3,2} - 10^{6,2}$ TCID₅₀/mL pour les virus et de 10^6 parasites/mL. Comme escompté, le seul organisme donnant une réaction croisée avec ce test est un isolat très toxigène de *Clostridium sordellii* (VPI 9048). Cet isolat produit de grandes quantités de toxines hémorragiques et léthales dont il a été montré qu'elles étaient immunologiquement et biologiquement comparables aux toxines A et B de *C. difficile*. La souche ATCC 12598 de *Staphylococcus aureus* Cowan, qui produit une protéine A, n'a pas donné de réaction croisée. En outre, les souches ATCC 43889, 43894 et 43895 de *Escherichia coli*, qui produisent des toxines similaires à Shigella (SLT), n'ont montré aucune réaction croisée. Les organismes suivants n'ont donné ni faux positifs dans des selles négatives pour la toxine A, ni faux négatifs dans des selles positives pour la toxine A.

Microorganismes (nb de souches testées)		
<i>Adenovirus</i> , types 2, 40, 41 (3)	<i>Clostridium perfringens</i> (1)	<i>Giardia intestinalis</i> (1)
<i>Aeromonas hydrophilia</i> (1)	<i>Clostridium septicum</i> (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)
<i>Bacillus cereus</i> (1)	<i>Clostridium sordellii</i> , VPI 9048 (1)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1)
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	<i>Clostridium sporogenes</i> (1)	<i>Proteus mirabilis</i> (1)
<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	<i>Clostridium subterminale</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)
<i>Campylobacter coli</i> (1)	<i>Clostridium tetani</i> (1)	<i>Rotavirus</i> , humain (1)
<i>Campylobacter fetus</i> (1)	<i>Coxsackie virus</i> , B1 (1)	<i>Salmonella choleraesuis</i> (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	<i>Cytomegalovirus</i> (1)	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
<i>Campylobacter laridis</i> (1)	<i>Echovirus</i> , type 22 (1)	<i>Shigella flexneri</i> (1)
<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Entamoeba histolytica</i> (1)	<i>Shigella sonnei</i> (1)
<i>Clostridium botulinum</i> , type A (1)	<i>Enterococcus faecalis</i> , ATCC 29212 (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 12598 (Cowan) (1)
<i>Clostridium butyricum</i> (1)	<i>Enterococcus faecium</i> , ATCC 51559 (résistant à la vancomycine) (1)	<i>Vibrio cholerae</i> (1)
<i>Clostridium histolyticum</i> (1)	<i>Enterovirus</i> , type 69 (1)	<i>Vibrio parahemolyticus</i> (1)
<i>Clostridium innocuum</i> (1)	<i>Escherichia coli</i> (4)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)
<i>Clostridium novyi</i> (1)		

Limite de la détection

La sensibilité analytique du test ColorPAC Toxin A a été évaluée grâce à l'ensemencement de concentrations connues de toxine A dans cinq échantillons chacune de selles liquides, semi-solides et solides. Les échantillons ensemencés ont été testés trois fois. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7
Limite de détection par type de selle

Matrice ensemencée à la toxine A	Gamme LDD (ng/mL)
Selles liquides	1,38 – 5,21
Selles semi-liquides	1,61 – 18,71
Selles solides	3,19 – 22,58

Reproductibilité du dosage

La reproductibilité du test ColorPAC Toxin A a été évaluée dans plusieurs laboratoires cliniques au moyen de tests de panels de selles consistant chacun en trois concentrations de toxine A et en un contrôle négatif antigénique de la toxine A. Des échantillons masqués ont été testés trois fois chaque jour, trois jours chacun, dans chacun des quatre sites d'essais cliniques. La reproductibilité intra- et inter-dosage pour le test ColorPAC Toxin A était de 100 %.

MATERIEL DISPONIBLE

No réf. Description
274030 ColorPAC Toxin A, *C. difficile*, coffret de 30 tests.

REFERENCES : Voir la rubrique « References » du texte anglais.

BD ColorPAC Toxin A

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

ColorPAC Toxin A ist ein chromatographischer Schnelltest zum qualitativen Nachweis von *Clostridium difficile* Toxin A (Enterotoxin) in Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf eine *C. difficile*-assoziierte Erkrankung. Der Test kann ebenfalls zur Bestätigung verdächtiger Kolonien toxigener *C. difficile*-Stämme von Agarplatten oder Hirn-Herz-Infus-Bouillon verwendet werden. Dieser Test dient als Hilfsmittel zur Diagnose einer *C. difficile*-assoziierten Erkrankung.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

C. difficile ist eine der Hauptursachen der Antibiotika-assoziierten Diarrhöe, die in ihrer schwersten Form in das klinische Syndrom der pseudomembranösen Colitis mit erheblicher Mortalität übergehen kann. Obwohl *C. difficile* als Bestandteil der bakteriellen Normalflora des Darms vorkommen kann, kann es nach Behandlung des Patienten mit Antibiotika und nachfolgender Veränderung der normalen Darmflora zu einem opportunistischen Krankheitserreger werden. Unter geeigneten Bedingungen produzieren die toxinproduzierenden Stämme von *C. difficile* zwei Toxine: Toxin A, ein gewebezerstörendes Enterotoxin, und Toxin B, ein In-Vitro Cytotoxin.¹ Laut Literaturangaben werden die Toxine A und B zur gleichen Zeit produziert.² Die mit der Erkrankung assoziierten klinischen Symptome werden in erster Linie auf Toxin A zurückgeführt, und zur Zeit gibt es keine überzeugenden Beweise für irgendeine wichtige biologische Rolle von Toxin B in der natürlich vorkommenden Erkrankung.³

Die am häufigsten verwendeten Hilfsmittel zur klinischen Diagnostik der durch *C. difficile* verursachten Antibiotika-assoziierten Colitis sind Cytotoxizitätstests an Zellkulturen (CTA), Latex-Agglutination (LA) und Enzymimmunoassays (EIA).⁴ CTA weist Toxin B durch seine zellschädigende Wirkung auf eine Zellkultur nach und erfordert ein bis zwei Tage bis zur Vervollständigung. Der Latex-Agglutinationstest dient nicht zum Nachweis von spezifischen Toxinen, sondern weist Antigene von *C. difficile* nach. Er wird jedoch als wertvoller Schnelltest angesehen, um zu bestimmen, ob *C. difficile* bei Patienten mit Diarrhöe eine ätiologische Rolle spielt.⁵ Enzymimmunoassays auf Mikrotiterplatten können Toxin A, und in manchen Fällen Toxin A und Toxin B gleichzeitig nachweisen.⁶

VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Der **ColorPAC Toxin A-Test** besteht aus einem gegen *C. difficile* Toxin A gerichteten Antikörper, der auf einem chromatographischen Teststreifen in der Testvorrichtung immobilisiert ist. Eine Probe (d.h. eine Stuhlprobe, Kolonien oder Hirn-Herz-Infus-Bouillon) wird mit Probenpuffer verdünnt und in die Probenvertiefung der Testvorrichtung gegeben. Die verdünnte Probe wird durch Kapillarkraft am Teststreifen nach oben gesaugt. Eventuell vorhandenes Toxin A bindet sich an den an der Testlinie vorhandenen Antikörper, wenn die Probe über den Teststreifen wandert. Die Waschlösung und die übrigen Reagenzien werden in die Reagenzienvertiefung der Testvorrichtung gegeben.

Nach Zugabe von Nachweisreagenz A wandern die einen rosafarbenen Farbstoff enthaltenden, mit Antikörper gegen Toxin A beschichteten Liposomen über den Teststreifen und binden sich an das *C. difficile* Toxin A-Antigen, das im vorherigen Schritt an den Teststreifen gebunden wurde. Die Farbbildung wird durch Zugabe eines zweiten Liposomen-Reagenzes verstärkt, und zwar Nachweisreagenz B, das sich an den Komplex bindet, der aus Nachweisreagenz A und Probenantigen an der Testlinie entstand. Nach einem abschließenden Waschschrift werden die Reaktionen visuell abgelesen. Wird Toxin A-Antigen in der Probe nachgewiesen, erscheinen eine rosafarbene Testlinie und eine rosafarbene Kontrolllinie, wodurch ein positives Testergebnis angezeigt wird. Liegt kein Toxin A vor, erscheint nur die rosafarbene Kontrolllinie, wodurch ein negatives Ergebnis angezeigt wird.

REAGENZIEN

ColorPAC Toxin A Test Kit:

- Reagenz 1** (30,0 mL) Probenpuffer: Gepufferte Kochsalzlösung mit einem mukolytischen Wirkstoff, 1 % Detergens.
- Reagenz 2** (1,5 mL) Nachweisreagenz A: Mit Kaninchen-Antikörper gegen *C. difficile* Toxin A beschichtete Liposomen.
- Reagenz 3** (1,5 mL) Nachweisreagenz B: Mit Kaninchen-Antikörper gegen Nachweisreagenz A beschichtete Liposomen.
- Reagenz W** (2,3 mL) Waschreagenz: Gepufferte Kochsalzlösung mit Rinderprotein-Stabilisator, 0,1 % Detergens.
- Kontrolle +** (1,0 mL) Positive Kontrolle: Gepufferte Kochsalzlösung mit Rinderprotein-Stabilisator, inaktiviertes *C. difficile* Toxin A.
- Kontrolle -** (1,0 mL) Negative Kontrolle: Gepufferte Kochsalzlösung mit Rinderprotein-Stabilisator. Reagenzien und Kontrollen enthalten jeweils 0,2 % Natriumazid (Konservierungsmittel).
- 30 Testvorrichtungen Jede Testvorrichtung enthält einen Teststreifen, der mit Kaninchen-Antikörper gegen *C. difficile* Toxin A und mit *C. difficile* Toxin A beschichtet ist.

30 SQ-EASY-Röhrchen und Filterspitzen.

Jeweils 30 Applikatorstäbchen und Transferpipetten.

1 Tropfpipette

Warnungen und Vorsichtsmassnahmen:

In-vitro-Diagnostikum.

Reagenzien: Nach Erhalt entweder das ganze Kit oder die Packung mit den Reagenzien bei 2 – 8 °C im Kühlschrank aufbewahren. NICHT EINFRIEREN. Reagenzfläschchen nach Gebrauch sofort wieder verschließen und im Kühlschrank aufbewahren. Darauf achten, dass die farbcodierten Deckel dabei nicht vertauscht werden. Verfallsdatum beachten. Nach der Entnahme aus dem Kühlschrank Reagenzien vor Verwendung Raumtemperatur erreichen lassen. Die Reagenzien nicht über einen längeren Zeitraum starker Lichteinstrahlung aussetzen.

Ausschließlich Reagenzien und Arbeitsmaterial derselben Chargen-Nr. verwenden.

Um eine korrekte Tropfenabgabe zu garantieren, muss das Reagenzienfläschchen bei der Abgabe senkrecht gehalten werden, sodass jeweils nur ein frei fallender Tropfen abgegeben wird.

Warnung: Die Reagenzien enthalten Natriumazid. Sehr giftig beim Einatmen, bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken. Bei Kontakt mit Säuren entstehen hochgiftige Gase. Bei Kontakt mit Haut sofort gründlich mit Wasser waschen. Natriumazid kann mit Blei- und Kupferleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit sehr viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen zu vermeiden.

Testvorrichtungen: Testvorrichtung erst unmittelbar vor Gebrauch aus dem Beutel herausnehmen. Ungeöffnete Vorrichtungen bei Raumtemperatur (15 – 30 °C) oder, falls gewünscht, im Kühlschrank (2 – 8 °C) lagern. Ungebrauchte Testvorrichtungen nicht wiederholt aus dem Kühlschrank herausnehmen, bei Raumtemperatur lagern und dann wieder in den Kühlschrank zurückbringen. Zum Einmalgebrauch; nicht wiederverwenden.

Kontrollen: Kit nicht verwenden, wenn positive und negative Kontrollen falsche Ergebnisse liefern. Die positive Kontrolle enthält inaktiviertes *C. difficile* Toxin A und muss wie potenziell infektiöses Material gehandhabt werden.

Transferpipetten: Zum Einmalgebrauch; nicht wiederverwenden.

Filterspitzen: Die Spitze muss weißes Filtermaterial enthalten, um eine korrekte Testleistung zu garantieren. Zum Einmalgebrauch; nicht wiederverwenden. Sicherstellen, dass die Filterspitze einrastet, sodass der obere Rand der Filterspitze mit dem Rand des SQ-EASY-Röhrchens abschließt.

Warnhinweis: Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, wie z.B. Hepatitis-Viren und HIV, enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen“⁷⁻¹⁰ sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten.

Alle bei der Durchführung des Tests verwendeten Materialien müssen in einen zugelassenen Behälter für biologische Gefahrenstoffe entsorgt werden. Die Proben können 60 min bei 121 °C autoklaviert oder 30 min mit einer 0,05% igen Lösung von Natriumhypochlorit (im Verhältnis 1:100 verdünnte Haushaltsbleiche) behandelt werden. *Materialien, die Natriumhypochlorit enthalten, dürfen nicht autoklaviert werden.*

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Stuhlproben werden in einem sauberen, luftdichten Behältnis ohne Konservierungsmittel gesammelt. Die Proben sollten so bald wie möglich nach dem Erhalt im Labor weiterverarbeitet werden; Aufbewahrung bei 2 – 8 °C für maximal 72 h ist jedoch möglich. Sollen Proben nach 72 Stunden getestet werden, sind sie sofort nach Erhalt im Labor bei mindestens -70 °C einzufrieren. Die Proben können bis zu 2 Monate lang eingefroren werden. Positive Proben zeigen nach drei Einfrier-/Auftau-Zyklen keine oder eine nur geringe Abnahme des im **ColorPAC Toxin A-Test** erfassten Toxins A.

Vor Gebrauch müssen die Stuhlproben auf Raumtemperatur erwärmt und möglichst gründlich gemischt werden.

Die Ergebnisse des **ColorPAC Toxin A-Tests** werden durch Ampicillin, Cephalexin, Metronidazol, Vancomycin, Bariumsulfat, Abführmittel, Blut und Antidiarrhöika im Stuhl nicht beeinflusst.

Tests auf *C. difficile* oder deren Toxine sollten möglichst mit diarrhöischen (ungeformten) Stuhlproben durchgeführt werden.⁷

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Alle Materialien, wie unter „Reagenzien“ aufgeführt.

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Vortex-Mixer und Zeitgeber, Mikropipettor (optional: Hirn-Herz-Infus-Bouillon oder *C. difficile*-Selektivagar, die nur zum Toxin A-Nachweis in *C. difficile*-Kulturisolaten benötigt werden, Zentrifuge mit einer Kapazität von 1500 x g – siehe „Testdurchführung“, Punkt 1).

Testdurchführung: Vor der Durchführung des Tests die Abschnitte „Sicherheitshinweise“ sowie „Probenentnahme und vorbereitung“ gut durchlesen. Der Testbereich, die Reagenzien, die Testproben und die Testbestandteile müssen bei der Verwendung Raumtemperatur aufweisen.

Alle Reagenzien vor Gebrauch durch Umdrehen vorsichtig mischen. Schaumbildung vermeiden.

VORBEREITUNG DER STUHLPROBEN – Siehe Abbildungen, Rückseite

1. Für jede zu untersuchende Probe einem SQ-EASY-Röhrchen mit einer Mikropipette oder der mitgelieferten Tropfpipette 1 mL **Reagenz 1** (Probenpuffer) zugeben.
2. Stuhlprobe möglichst gründlich mischen. Bei flüssigen oder halbflüssigen Stuhlproben 0,5 mL Probe mit der mitgelieferten Transferpipette in das Röhrchen mit **Reagenz 1** überführen. Bei festen Stuhlproben zwei erbsengroße Proben (0,5 g) aus verschiedenen Probenbereichen mit Hilfe des mitgelieferten Applikatorstäbchens oder eines Holzspatels entnehmen und in das Röhrchen mit **Reagenz 1** überführen. Röhrchen vor dem Mischen im Vortex-Mixer mit einer Filterspitze verschließen.
3. Röhrchen 15 sec bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex-Mixer mischen. Die verdünnte Probe ist nun gebrauchsfertig. Probe wie unter „Testdurchführung“ beschrieben testen.

VORBEREITUNG VON PROBEN AUS AGARKOLONIEN ODER HIRN-HERZ-INFUS-BOUILLON – (optional)

Toxin A-Prüfung von Agarmedienkulturen:

1. Die Agaroberfläche von 42 – 48 h alten Kulturen auf verdächtige Kolonien prüfen, die den morphologischen Merkmalen und dem Gramfärbeverhalten von *C. difficile* entsprechen.
2. Mit einer Mikropipette oder der mitgelieferten Tropfpipette 1 mL **Reagenz 1** (Probenpuffer) in ein 12 x 75 mm Reagenzröhrchen geben. Die verdächtigen isolierten Kolonien aseptisch in das Röhrchen übertragen, bis die Suspension einem McFarland-Trübungsstandard von 2,0 entspricht.
3. Die Bakteriensuspension visuell mit einem McFarland-Standard von 2,0 vergleichen. Bei Bedarf zusätzliches **Reagenz 1** zugeben, um die Suspension auf einen McFarland-Trübungsstandard von 2,0 einzustellen.
4. Röhrchen 15 sec bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex-Mixer mischen. Die verdünnte Probe ist nun gebrauchsfertig.
5. Probe wie unter „Testdurchführung“ beschrieben testen.

Toxin A-Prüfung aus Hirn-Herz-Infus-Bouillon:

1. Mit einer Mikropipette oder der mitgelieferten Tropfpipette 1 mL **Reagenz 1** (Probenpuffer) in ein SQ-EASY-Röhrchen geben.
2. Dem Röhrchen 0,5 mL einer 72 h alten, *C. difficile*-verdächtigen Hirn-Herz-Infus-Bouillonkultur zugeben. Das Röhrchen vor dem Mischen im Vortex-Mixer mit einer Filterspitze verschließen.
3. Röhrchen 15 sec bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex-Mixer mischen. Die verdünnte Probe ist nun gebrauchsfertig.
4. Probe wie unter „Testdurchführung“ beschrieben testen.

Siehe Abbildungen, Rückseite

Testdurchführung:

Genügend Testvorrichtungen für die Zahl der zu testenden Proben und Kontrollen öffnen.

1. In die Probenvertiefung einer Testvorrichtung 3 Tropfen (125 µL) der verdünnten Probe geben. Probe 3 min absorbieren lassen.
HINWEIS: In seltenen Fällen ist bei Proben, die nicht die Filterspitze passieren, eine Zentrifugation bei mindestens 1500 x g für 10 min erforderlich. Danach mit einer Mikropipette 125 µL des Überstandes in die Probenvertiefung einer neuen Testvorrichtung geben.
 An Stelle der verdünnten Probe können der Probenvertiefung 2 Tropfen **Kontrolle +** oder **Kontrolle -** zur Qualitätskontrolle zugegeben werden.
2. 1 Tropfen **Reagenz W** (Waschreagenz) in die Reagenzienvertiefung geben und absorbieren lassen.
3. 1 Tropfen **Reagenz 2** (Nachweisreagenz A) in die Reagenzienvertiefung geben und 3 min warten.
4. 1 Tropfen **Reagenz W** (Waschreagenz) in die Reagenzienvertiefung geben und absorbieren lassen.
HINWEIS: Bei stark reaktiven Proben kann bereits vor Abschluss der Schritte 5 und 6 eine rosafarbene Testlinie (positiv) im Fenster der Testvorrichtung erscheinen.
5. 1 Tropfen **Reagenz 3** (Nachweisreagenz B) in die Reagenzienvertiefung geben und 3 min warten.
6. 1 Tropfen **Reagenz W** (Waschreagenz) in die Reagenzienvertiefung geben und absorbieren lassen. Bei guten Lichtverhältnissen nach 1 min in einer gut beleuchteten Umgebung ablesen. Die Farbintensität und der Hintergrund können sich nach einer gewissen Zeit ändern, die Ergebnisse können jedoch weitere 10 min lang abgelesen werden.

Qualitätskontrolle: Beim Öffnen eines neuen Kits müssen die flüssigen Kontrollen **Kontrolle +** und **Kontrolle -** getestet werden, um die Leistungsfähigkeit der Reagenzien und der Testvorrichtung zu überprüfen. Der Probenvertiefung 2 Tropfen **Kontrolle +** oder **Kontrolle -** zugeben. 3 min lang absorbieren lassen. Mit Schritt 2 unter „Testdurchführung“ fortfahren.

Optional: **Kontrolle +** kann mit **Reagenz 1** verdünnt und getestet werden, um eine schwächer positive Reaktion wie folgt darzustellen:

1. 1,5 mL **Reagenz 1** (Probenpuffer) und einen freifallenden Tropfen **Kontrolle +** in ein Reagenzröhrchen geben. Vorsichtig mischen.
2. 1,0 mL **Reagenz 1** (Probenpuffer) in ein SQ-EASY-Röhrchen geben.
3. Mit einer Transferpipette 0,5 mL der verdünnten **Kontrolle +** aus dem ersten Röhrchen in das SQ-EASY-Röhrchen übertragen.
4. Das SQ-EASY-Röhrchen mit einer Filterspitze abdecken. Sicherstellen, dass der Filter einrastet.
5. Röhrchen 15 sec bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex-Mixer mischen. Die verdünnte Probe ist nun gebrauchsfertig. Probe wie unter „Testdurchführung“ beschrieben testen.

Die **ColorPAC** Toxin A-Testvorrichtung enthält zwei integrierte Kontrollen. Das Erscheinen einer rosafarbenen Linie im Testfenster (Bereich „C“) dient als interne Kontrolle zur Validierung der immunologischen Reaktivität der Testvorrichtung, der Funktionstüchtigkeit der Nachweisreagenzien und der korrekten Testdurchführung. Der Membranbereich (Hintergrund) dient als interne negative Kontrolle und gewährleistet, dass das Testergebnis nicht durch eine unspezifische Farbentwicklung beeinträchtigt wird.

Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die laborinternen Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Benutzer sollten die relevanten CLSI-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

Die Patientenergebnisse sind ungültig, wenn die positiven und negativen Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse liefern.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Siehe Abbildungen, Rückseite

Positiver Test: Ein Ergebnis ist **positiv**, wenn eine rosafarbene Testlinie **beliebiger Intensität** im Testfenster (Bereich „T“) erscheint. Das bedeutet, dass *C. difficile* Toxin A in der Patientenprobe nachgewiesen wurde. Eine rosafarbene Kontrolllinie beliebiger Intensität sollte im Testfenster (Bereich „C“) erscheinen. Bestimmte stark positive Reaktionen können eine Abnahme der Intensität der Kontrolllinie verursachen. Die Hintergrundintensität darf die Kontrolllinie nicht verdecken.

Negativer Test: Ein Ergebnis ist **negativ**, wenn im Testfenster (Bereich „T“) keine sichtbare Testlinie vorhanden ist. Das bedeutet, dass *C. difficile* Toxin A in der Patientenprobe nicht nachgewiesen wurde. Eine rosafarbene Kontrolllinie **beliebiger Intensität** sollte im Testfenster (Bereich „C“) erscheinen. Bestimmte Patientenproben können einen dunkel gefärbten Hintergrund verursachen, was zu einer verringerten Intensität der Kontrolllinie führen kann.

Wie bei vielen diagnostischen Stuhltests auf *C. difficile*-Toxin sollte dieselbe oder eine andere Stuhlprobe mit einem anderen Verfahren getestet werden, wenn das Ergebnis negativ ausfällt, die Symptome jedoch weiter bestehen und Verdacht auf eine *C. difficile*-assoziierte Diarrhöe besteht.

Nicht interpretierbarer Test: Das Ergebnis ist **nicht interpretierbar**, wenn im Testfenster (Bereich „C“) keine rosafarbene Kontrolllinie vorhanden ist oder wenn der Hintergrund das Ablesen der Kontrolllinie verhindert.

Wenn der Test nicht interpretierbar ist, muss eine neue Probe angesetzt, 10 min bei mindestens 1500 x g zentrifugiert und wie in Schritt 1 bis 6 des Abschnitts „Testdurchführung“ beschrieben getestet werden. Wenn das Ergebnis weiterhin nicht interpretiert werden kann, sollte eine neue Stuhlprobe angefordert werden.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Der **ColorPAC Toxin A-Test** dient lediglich zum Nachweis von Toxin A im Stuhl, nicht einer *C. difficile*-assoziierten manifesten Erkrankung. Bisher wurde noch kein Zusammenhang zwischen dem Toxinspiegel und dem Vorliegen oder Fehlen einer Erkrankung nachgewiesen. Diese Testergebnisse sollten unter Berücksichtigung anderer Laborergebnisse und klinischer Symptome von einem Arzt ausgewertet werden.

Eine *C. difficile*-assoziierte Diarrhöe (CDAD) sollte bei jedem Patienten vermutet werden, der innerhalb der vergangenen 2 Monate Antibiotika erhalten hat und/oder dessen Diarrhöe 72 h oder länger nach einem Krankenhausaufenthalt begonnen hat.¹¹

Faktoren, wie z.B. Fehler bei der Durchführung des Tests und im Stuhl vorhandene Substanzen, die nicht unter „Probenentnahme und -handhabung“ aufgeführt sind, können den Test beeinträchtigen und zu falschen Ergebnissen führen.

Bei einigen Isolaten von *Clostridium sordellii* wurde die Bildung eines hämorrhagischen Toxins (HT) nachgewiesen, das ähnliche biologische, biochemische und immunchemische Eigenschaften wie Toxin A aufweist. HT kann bei Tests auf Toxin A möglicherweise Kreuzreaktivität zeigen.⁴ In Patienten mit Antibiotika-assoziiierter Diarrhöe und Colitis wurden die HT-Stämme von *C. sordellii* nicht nachgewiesen.

Bei Kleinkindern und Patienten mit Mukoviszidose kann *C. difficile* Toxin im Stuhl vorliegen, ohne dass dies von klinischer Bedeutung wäre.^{12,13}

Die Leistungsmerkmale des **ColorPAC Toxin A-Tests** bei Kindern unter 12 Jahren wurden noch nicht ermittelt.

In Labors von Arztpraxen oder anderen Behandlungszentren wurden bisher noch keine Leistungsstudien durchgeführt.

Wie bei anderen Tests ist die korrekte Probenhandhabung wichtig zur Erhaltung der Toxin A-Titer. Verschiebt sich der Test um mehr als 72 h, sollten die Proben bei mindestens -70 °C eingefroren werden (siehe Abschnitt „Probenentnahme und -handhabung“).

ZU ERWARTENDE WERTE

Clostridium difficile ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der seine toxischen Wirkungen ausübt, wenn der Darmtrakt in irgendeiner Weise kompromittiert wurde, z.B. durch Antibiotika-Therapie. Patienten mit kürzlicher Antibiotika-Therapie oder Patienten in chronischen Pflegesituationen sind deshalb am häufigsten infiziert. Man schätzt, dass bis zu 15 % aller gesunden Erwachsenen positive Tests auf Cytotoxin im Stuhl aufweisen.^{14,15} Die Häufigkeit der *C. difficile*-Infektion bei Patienten mit Diarrhöe variiert je nach Institution, den Haushaltsgewohnheiten und der Patientenbevölkerung. Bei der Untersuchung verdächtiger Proben mit dem **ColorPAC Toxin A-Test** im Rahmen von klinischen Prüfungen an vier großen, unabhängigen klinischen Zentren wurden bei 8,5 % – 13,5 % der symptomatischen Patienten positive Ergebnisse erzielt.¹⁶

LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsfähigkeit des **ColorPAC Toxin A-Tests** wurde in Untersuchungen an vier großen, unabhängigen klinischen Zentren bestimmt. Die Untersuchungsorte befanden sich in geographisch unterschiedlichen Bereichen in den Vereinigten Staaten. Insgesamt wurden 598 frische und 162 gefrorene Stuhlproben von symptomatischen Patienten mit Verdacht auf *C. difficile*-assoziierte Erkrankung untersucht. An jedem Untersuchungsort wurde der routinemäßig durchgeführte Cytotoxin-B-Assay mit dem **ColorPAC Toxin A-Test** verglichen. Nur bei 0,1 % der Stuhlproben war Zentrifugation und wiederholtes Testen zur Interpretation des Ergebnisses erforderlich. Die Ergebnisse dieses anfänglichen Vergleichs sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

Vergleich von ColorPAC Toxin A-Ergebnissen mit Cytotoxin B-Ergebnissen

Standort	Nr.	ColorPAC Toxin A	Cytotoxin B-Ergebnisse			95% Vertrauensintervalle
			Positiv	Negativ		
1	240	Positiv	028	006	Sensitivität 82 % Spezifität 97 %	(65,5 %, 93,2 % (93,8 %, 98,9 %)
		Negativ	006	200		
2	135	Positiv	018	001	Sensitivität 90 % Spezifität 99 %	(68,3 %, 98,8 %) (95,3 %, 99,9 %)
		Negativ	002	114		
3	207	Positiv	021	011	Sensitivität 81 % Spezifität 94 %	(60,7 %, 93,5 %) (89,4 %, 96,9 %)
		Negativ	005	170		
4	178	Positiv	029	001	Sensitivität 74 % Spezifität 99 %	(57,9 %, 87,0 %) (96,1 %, 100 %)
		Negativ	010	138		
Zusammen	760	Positiv	096	019	Sensitivität 81 % Spezifität 97 %	(72,4 %, 87,3 %) (95,4 %, 98,2 %)
		Negativ	023	622		

Aufgrund der fehlenden Standardisierung von Cytotoxin-Assays wurden Proben mit widersprüchlichen Ergebnissen anhand von Toxinkulturen näher untersucht. Der Vergleich der widersprüchlichen Ergebnisse des ColorPAC Toxin A-Tests mit den Ergebnissen des Cytotoxin-Tests ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2

Vergleich von ColorPAC Toxin A-Ergebnissen mit Cytotoxin B-Ergebnissen mit einer Auflösung aus Nichtkonformen Proben

Standort	Nr.	ColorPAC Toxin A	Cytotoxin B-Ergebnisse	
			Positiv	Negativ
1	240	Positiv	030	004
		Negativ	005	201
2	135	Positiv	018	001
		Negativ	000	116
3	207	Positiv	022	010
		Negativ	000	175
4	178	Positiv	029	001
		Negativ	007	141
Zusammen	760	Positiv	099	016
		Negativ	012	633

Wie bereits im Abschnitt „Zu erwartende Werte“ erwähnt, wurden bei der Untersuchung verdächtiger Proben mit dem ColorPAC Toxin A-Test im Rahmen von klinischen Prüfungen an vier großen, unabhängigen klinischen Zentren bei 8,5 % – 13,5 % der symptomatischen Patienten positive Ergebnisse erzielt. Die positiven und negativen Vorhersagewerte (PPV, NPV) für jeden Untersuchungsort sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Werte beruhen auf dem tatsächlichen Krankheitsvorkommen und den Leistungsmerkmalen des Tests an jedem Untersuchungsort.

Tabelle 3

ColorPAC Toxin A – positive und negative Vorhersagewerte basierend auf dem tatsächlichen Vorkommen und den Leistungsmerkmalen

Standort	Sensitivität	Spezifität	Prävalenz	PPV	NPV
1	82 %	97 %	8,5 %	72 %	98 %
2	90 %	99 %	13,5 %	93 %	98 %
3	81 %	94 %	10,2 %	61 %	98 %
4	74 %	99 %	11,1 %	90 %	97 %

Der ColorPAC Toxin A-Test wurde ebenfalls mit drei Enzymimmunoassays (EIA) verglichen. Jede der klinischen Untersuchungsstellen führte für jede Probe mindestens einen EIA, einen ColorPAC Toxin A-Test und einen Cytotoxin B-Test durch. Die Ergebnisse jedes Toxin A-Assays im Vergleich mit dem Cytotoxin B-Test sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4

Kombinierter Standortvergleich von Toxin A-Assays mit Cytotoxin B

Leistung	ColorPAC Toxin A	RIA-Verfahren 1	RIA-Verfahren 2	RIA-Verfahren 3
Empfindlichkeit	81 %	80 %	74 %	86 %
Spezifität	97 %	97 %	98 %	98 %
Übereinstimmung	95 %	94 %	94 %	96 %
% anfänglich nicht interpretierbarer oder unbestimmt	0,1 %	0,9 %	2,4 %	0 %

Bestätigung von Kolonien

Die Leistungsfähigkeit des ColorPAC Toxin A-Tests zur kulturellen Bestätigung toxinproduzierender *C. difficile*-Stämme bei verdächtigen Kolonien aus Selektivagar, Anaerobier-Blutagar und Hirn-Herz-Infus-Bouillon wurde in einer Studie geprüft. Von jedem Medium wurden insgesamt 111 klinische Isolate, die den morphologischen Merkmalen von *C. difficile* entsprachen, mit dem ColorPAC Toxin A-Test untersucht. Nach der Identifizierung der Kolonien anhand biochemischer Methoden wurde die Toxigenität mit einem Cytotoxin B-Assay bestimmt. Die Ergebnisse dieses anfänglichen Vergleichs sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5

Vergleich von ColorPAC Toxin A-Ergebnissen mit Cytotoxin B – Bestätigung von Kolonien anhand des Medientyps (anfängliche Tests)

Medientyp	Anz. Proben	Sensitivität		Spezifität	
		95% Vertrauensintervalle		95% Vertrauensintervalle	
HHI-Bouillon	111	52/55	95 % (84,9 %, 98,8 %)	52/56	93 % (82,7 %, 98,0 %)
Selektiver Agar	111	52/55	95 % (84,9 %, 98,8 %)	52/56	93 % (82,7 %, 98,0 %)
Anaerobier Blutagar	111	49/55	89 % (77,7 %, 95,9 %)	53/56	95 % (85,1 %, 98,9 %)

Widersprüchliche Ergebnisse wurden durch Prüfung der Toxin A-Produktion der Kolonien mit Hilfe eines Toxin A-EIA näher untersucht. Der Vergleich der widersprüchlichen Ergebnisse des ColorPAC Toxin A-Tests mit den Ergebnissen des Cytotoxin B-Tests und der Toxin A-Methode ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6

Vergleich von ColorPAC Toxin A-Ergebnissen mit Cytotoxin B – Bestätigung von Kolonien anhand des Medientyps (mit Auflösung)

Medientyp	Anz. Proben	Sensitivität	Spezifität
HHI-Bouillon	111	55/55	55/56
Selektiver Agar	111	55/55	55/56
Anaerobier Blutagar	111	52/55	56/56

Kreuzreaktivität: Der ColorPAC Toxin A-Test wurde auf Kreuzreaktivität geprüft, indem Toxin A-positive und Toxin A-negative Stuhlproben mit Mikroorganismen (d.h. Bakterien, Hefepilzen, Viren und Parasiten) bis auf eine Endkonzentration von 10^7 – 10^8 KBE/mL bei Bakterien und Hefepilzen, $10^{3,2}$ – $10^{6,2}$ TCID₅₀/mL bei Viren oder 10^6 Parasiten/mL inokuliert wurden. Erwartungsgemäß war der einzige Organismus mit Kreuzreaktivität in diesem Test ein hochtoxigenes Isolat von *Clostridium sordellii* (VPI 9048). Dieses Isolat produziert hohe Konzentrationen hämorrhagischer und letaler Toxine, die immunologisch und biologisch den Toxinen A und B von *C. difficile* ähnlich sind. Der Stamm *Staphylococcus aureus* Cowan ATCC 12598, der Protein A produziert, zeigte keine Kreuzreaktivität. Die Stämme *Escherichia coli* ATCC 43889, 43894 und 43895, die shigellenartige Toxine (SLT) produzieren, zeigten ebenfalls keine Kreuzreaktivität. Die folgenden Mikroorganismen lieferten keine falsch-positiven Ergebnisse bei Toxin A-negativen Stuhlproben und keine falsch-negativen Ergebnisse bei Toxin A-positiven Stuhlproben.

Mikroorganismi (Anz. der getesteten Stämme)		
<i>Adenovirus</i> , typ 2, 40, 41 (3)	<i>Clostridium perfringens</i> (1)	<i>Giardia intestinalis</i> (1)
<i>Aeromonas hydrophilia</i> (1)	<i>Clostridium septicum</i> (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)
<i>Bacillus cereus</i> (1)	<i>Clostridium sordellii</i> , VPI 9048 (1)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1)
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	<i>Clostridium sporogenes</i> (1)	<i>Proteus mirabilis</i> (1)
<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	<i>Clostridium subterminale</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)
<i>Campylobacter coli</i> (1)	<i>Clostridium tetani</i> (1)	<i>Rotavirus</i> , human (1)
<i>Campylobacter fetus</i> (1)	<i>Coxsackie virus</i> , B1 (1)	<i>Salmonella choleraesuis</i> (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	<i>Cytomegalovirus</i> (1)	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
<i>Campylobacter laridis</i> (1)	<i>Echovirus</i> , typ 22 (1)	<i>Shigella flexneri</i> (1)
<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Entamoeba histolytica</i> (1)	<i>Shigella sonnei</i> (1)
<i>Clostridium botulinum</i> , typ A (1)	<i>Enterococcus faecalis</i> , ATCC 29212 (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 12598 (Cowan) (1)
<i>Clostridium butyricum</i> (1)	<i>Enterococcus faecium</i> , ATCC 51559 (Vancomycin resistent) (1)	<i>Vibrio cholerae</i> (1)
<i>Clostridium histolyticum</i> (1)	<i>Enterovirus</i> , typ 69 (1)	<i>Vibrio parahemolyticus</i> (1)
<i>Clostridium innocuum</i> (1)	<i>Escherichia coli</i> (4)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)
<i>Clostridium novyi</i> (1)		

Nachweisgrenze

Die analytische Empfindlichkeit des **ColorPAC Toxin A-Tests** wurde geprüft, indem je 5 Proben von flüssigem, halbflüssigem und festem Stuhl mit bekannten Konzentrationen von Toxin A beimpft wurden. Die beimpften Proben wurden dreifach getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7

Nachweisgrenze nach Stuhltyp

Toxin A, beimpfte Matrix	Nachweisgrenzbereich (ng/mL)
Flüssiger Stuhl	1,38 – 5,21
Halbfester Stuhl	1,61 – 18,71
Fester Stuhl	3,19 – 22,58

Reproduzierbarkeit des Assays

Die Reproduzierbarkeit des **ColorPAC Toxin A-Tests** wurde an mehreren klinischen Labors anhand von Testreihen mit drei verschiedenen Toxin A-Konzentrationen und einer Toxin A-negativen Antigenkontrolle geprüft. Die Blindproben wurden an jedem der vier klinischen Untersuchungsorte an drei Tagen einmal täglich in einem dreifachen Ansatz geprüft. Die Intra- und Interassay-Reproduzierbarkeit des **ColorPAC Toxin A-Tests** betrug dabei 100 %.

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.-Nr.	Beschreibung
274030	ColorPAC Toxin A , <i>C. difficile</i> , 30 Tests pro Testkit.

LITERATUR: S. „References“ im englischen Text.

BD ColorPAC Toxin A

Italiano

USO PREVISTO

Il test **ColorPAC Toxin A** (test **ColorPAC** della tossina A) è un dosaggio cromatografico rapido per la rilevazione qualitativa della tossina A (enterotossina) di *Clostridium difficile* in campioni fecali di pazienti che si sospetta siano affetti da malattia associata a *C. difficile*. Il test può essere usato anche come conferma della presenza di colonie tossigene sospette di *C. difficile* da piastre di agar o brodo BHI (infuso cuore-cervello). Questo dosaggio è destinato a supportare la diagnosi di malattia associata a *C. difficile*.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

C. difficile è una causa importante della diarrea associata ad antibiotici che, nella forma più grave, può esitare in sindrome clinica di colite pseudo-membranosa con mortalità significativa. Pur potendo far parte della normale flora batterica intestinale, *C. difficile* può trasformarsi in agente patogeno opportunista in seguito a trattamento del paziente con antibiotici e alla conseguente alterazione della normale flora intestinale. In condizioni favorevoli, due sono le tossine generate dai ceppi di *C. difficile* produttori di tossine: la tossina A, un'enterotossina che attacca i tessuti, e la tossina B, una citotossina in vitro.¹ Secondo la letteratura, le tossine A e B vengono prodotte contemporaneamente.² Si ritiene che i sintomi clinici associati alla malattia siano essenzialmente dovuti alla tossina A, anche se a tutt'oggi non sono emersi dati comprovanti un'attività biologica significativa della tossina B nella malattia naturale.³

Le metodiche più comuni di supporto clinico-diagnostico per la colite da *C. difficile* associata ad antibiotici sono i dosaggi di citotossicità su colture cellulari (CTA), l'agglutinazione al latex (LA) e i dosaggi immunoenzimatici (EIA).⁴ Il CTA – il cui completamento richiede da uno a due giorni – rileva la tossina B grazie all'effetto citopatico sulla coltura cellulare. L'agglutinazione al latex rileva gli antigeni di *C. difficile* anziché le tossine specifiche, ma è considerata un dosaggio rapido prezioso in quanto permette di accertare l'eventuale ruolo eziologico di *C. difficile* nei casi di diarrea.⁵ I dosaggi immunoenzimatici su micropozzetto sono in grado di rilevare la tossina A o, in alcuni casi, sia la tossina A che la tossina B contemporaneamente.⁶

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il test **ColorPAC Toxin A** comprende un anticorpo di cattura della tossina A di *C. difficile* immobilizzato su una striscia per dosaggio cromatografico, contenuta nel dispositivo del test. Il campione (ossia feci, colonie o brodo BHI) viene diluito con un tampone per campioni e dispensato nell'apposito pozzetto del dispositivo di test. Il campione diluito impregna la striscia cromatografica mediante azione capillare. La tossina A eventualmente presente si lega all'anticorpo di cattura sulla linea del test a mano a mano che il campione migra nella striscia cromatografica. Nel pozzetto del reagente vengono poi dispensati il reagente di lavaggio e altri reagenti.

L'aggiunta del rivelatore A fa sì che i liposomi rivestiti di anticorpi contro la tossina A e contenenti un colorante rosa migrino nella striscia del test e si leghino all'antigene della tossina A di *C. difficile* fissato alla striscia cromatografica nella fase precedente. Lo sviluppo di colore è amplificato dall'aggiunta di un secondo reagente ai liposomi, il rivelatore B, che si lega al complesso formato dal rivelatore A e dall'antigene del campione sulla linea del test. Dopo l'ultimo lavaggio, si effettua la lettura visiva delle reazioni. La rilevazione dell'antigene della tossina A nel campione è segnalata dalla comparsa di una linea rosa di test e di una linea rosa di controllo, indicanti che il test è positivo. In caso di assenza della tossina A, appare soltanto la linea rosa di controllo, a indicare un risultato negativo.

REAGENTI

Kit per il test **ColorPAC Toxin A**

Reagente 1	(30,0 mL)	Tampone per campioni - Soluzione fisiologica tampone con agente mucolitico, detergente allo 1%.
Reagente 2	(1,5 mL)	Rivelatore A - Liposomi rivestiti di anticorpi di coniglio della tossina A di <i>C. difficile</i> .
Reagente 3	(1,5 mL)	Rivelatore B - Liposomi rivestiti di anticorpi di coniglio specifici per il rivelatore A.
Reagente W	(2,3 mL)	Reagente di lavaggio - Soluzione fisiologica tampone con stabilizzante di proteina bovina, detergente allo 0,1%.
Controllo +	(1,0 mL)	Controllo positivo - Soluzione fisiologica tampone con stabilizzante di proteina bovina, tossina A di <i>C. difficile</i> disattivata.
Controllo -	(1,0 mL)	Controllo negativo - Soluzione fisiologica tampone con stabilizzante di proteina bovina. I reagenti e i controlli contengono sodio azide allo 0,2% (conservante).
30 Dispositivi di test		Ciascuno contenente una striscia di test rivestita di anticorpi monoclonali della tossina A di <i>C. difficile</i> e di tossina A di <i>C. difficile</i> .

30 provette e beccucci a filtro SQ-EASY.

30 bastoncini applicatori e 30 pipette da trasferimento.

1 contagocce

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti - Al ricevimento, refrigerare il kit oppure rimuovere dalla scatola la confezione di reagenti che richiede refrigerazione e conservarla a 2 – 8 °C. **NON CONGELARE**. Richiudere immediatamente i flaconi dei reagenti e conservarli in frigorifero, facendo attenzione a non scambiare i tappi codificati in base ai colori. Non usare oltre la data di scadenza. Una volta estratti i reagenti dal frigorifero, attendere che si portino a temperatura ambiente prima dell'uso. Evitare l'esposizione prolungata dei reagenti a luce forte.

Non scambiare, mescolare o combinare reagenti e dispositivi provenienti da lotti di kit diversi.

Per garantire una dispensazione appropriata delle gocce, tenere i flaconi dei reagenti in posizione verticale e dispensare lasciando cadere una goccia alla volta.

Avvertenza - I reagenti contengono sodio azide. Altamente tossico per inalazione, contatto con la pelle e ingestione. A contatto con acidi, libera gas altamente tossici. In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente e abbondantemente con acqua. La sodio azide può reagire con il piombo e il rame delle tubature, formando azidi metalliche altamente esplosive. Eliminare la sodio azide facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi per impedire l'accumulo di azidi.

Dispositivi per il test - Rimuovere il dispositivo dalla busta solo al momento dell'uso. Conservare i dispositivi non ancora aperti a temperatura ambiente (15 – 30 °C) o in frigorifero (2 – 8 °C), se si desidera. Non esporre i dispositivi non utilizzati a ripetuti passaggi di temperatura (dal frigorifero a temperatura ambiente e viceversa). Monouso; non riutilizzare.

Controlli - Non usare il kit se i controlli positivi o negativi non danno risultati appropriati. Il controllo positivo contiene tossina A di *C. difficile* inattivata e deve essere manipolato come materiale a rischio microbiologico.

Pipette di trasferimento - Monouso; non riutilizzare.

Beccucci a filtro - Il beccuccio deve contenere un materiale filtrante bianco per assicurare una corretta performance del test. Monouso; non riutilizzare. Assicurarsi che il beccuccio a filtro sia montato in modo tale da avere il bordo superiore a livello della sommità della provetta SQ-EASY.

Avvertenza - I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e i virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle linee guida dell'istituto e alle "Precauzioni standard".⁷⁻¹⁰

Eliminare tutti i materiali usati durante l'esecuzione del test in un contenitore approvato per rifiuti a rischio biologico. I campioni possono essere sterilizzati in autoclave per 60 min a 121 °C o trattati per 30 min con una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,05% (diluizione 1:100 di candeggina). *Non trattare in autoclave i materiali contenenti ipoclorito di sodio.*

RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Raccogliere i campioni di feci in un contenitore ermetico senza agenti conservanti. Testare i campioni non appena pervengono in laboratorio. I campioni possono tuttavia essere conservati per un massimo di 72 h a 2 – 8 °C. Se non è possibile testare i campioni entro 72 h, congelarli a -70° C non appena pervengono in laboratorio. I campioni possono essere congelati per un massimo di 2 mesi. Dopo tre cicli di congelamento-scongelo, i campioni positivi evidenziano poca o nessuna riduzione della tossina A rilevata dal test **ColorPAC Toxin A**.

Prima dell'uso, attendere che i campioni fecali si portino a temperatura ambiente e mescolarli il più accuratamente possibile.

I risultati di **ColorPAC Toxin A Test** non vengono alterati da ampicillina, cefalexina, metronidazole, vancomicina, solfato di bario, lassativi, sangue e farmaci antidiarroici eventualmente presenti nelle feci.

Si consiglia di eseguire i test per *C. difficile* o rispettive tossine su campioni fecali diarroici (non formati).⁷

PROCEDURA

Materiali forniti - Tutti i materiali elencati nella sezione "Reagenti".

Materiali necessari ma non forniti - Miscelatore vortex e timer, micropipetta, (facoltativi: brodo di infuso cuore-cervello o agar selettivo per *C. difficile*, necessari soltanto per la rilevazione della tossina A in isolati di colture di *C. difficile*, centrifuga con capacità di 1500 x g, vedi "Procedura del test", punto 1).

Performance del test - Prima di iniziare il test, consultare le sezioni "Precauzioni" e "Raccolta e preparazione dei campioni". Prima dell'uso, l'area di test, i reagenti, i campioni da testare e tutti i componenti da utilizzare nel test devono essere a temperatura ambiente.

Prima di usare i reagenti, mescolarli delicatamente alcune volte capovolgendone i flaconi. Evitare la formazione di schiuma.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI FECALI – Vedere le illustrazioni sulla retrocopertina

1. Con una micropipetta o il contagocce fornito, dispensare 1 mL di **Reagente 1** (tampone per campioni) in una provetta SQ-EASY per ogni campione da testare.
2. Mescolare il campione fecale il più accuratamente possibile. In caso di feci liquide o semisolide, pipettare 0,5 mL di campione nella provetta contenente il **Reagente 1** usando una delle pipette da trasferimento fornite. Per le feci solide, usare un bastoncino applicatore o la spatola di legno fornita per prelevare due quantitativi di campione della grandezza di piselli (0,5 g) da zone diverse e trasferirli nella provetta contenente il **Reagente 1**. Tappare la provetta con un beccuccio a filtro prima di vortexare.
3. Vortexare la provetta per 15 sec ad alta velocità. Il campione diluito è pronto per l'uso. Iniziare la procedura del test.

PREPARAZIONE DI CAMPIONI DI COLTURE SU AGAR E BRODO BHI – (Procedura facoltativa)

Test della tossina A da coltura di terreno su piastra–

1. Sulla superficie dell'agar seminato da 42 – 48 h, individuare colonie sospette con caratteristiche morfologiche e di colorazione di Gram tipiche di *C. difficile*.
2. Con una micropipetta o il contagocce fornito, dispensare 1 mL di **Reagente 1** (tampone per campioni) in una provetta di coltura da 12 x 75 mm. Trasferire in asepsi un numero di colonie sospette sufficiente a ottenere un grado di torbidità McFarland pari a 2,0.
3. Eseguire una comparazione visiva della sospensione batterica rispetto allo standard McFarland 2,0. Se necessario, dispensare altro **Reagente 1** per portare la torbidità McFarland a 2,0.
4. Vortexare la provetta per 15 sec ad alta velocità. Il campione diluito è pronto per l'uso.
5. Iniziare la procedura del test.

Test della tossina A da brodo BHI–

1. Con una micropipetta o il contagocce fornito, dispensare 1 mL di **Reagente 1** (tampone per campioni) in una provetta SQ-EASY.
2. Dispensare 0,5 mL di brodo BHI preparato da 72 h con una coltura sospetta di *C. difficile*. Prima di vortexare, tappare la provetta con un beccuccio a filtro.
3. Vortexare la provetta per 15 sec ad alta velocità. Il campione diluito è pronto per l'uso.
4. Iniziare la procedura del test.

Vedere le illustrazioni sulla retrocopertina

Procedura del test

Aprire un numero di dispositivi per test sufficiente per i campioni e i controlli da testare.

1. Dispensare 3 gocce di campione diluito (125 µL) nel pozzetto del campione di un dispositivo di test. Lasciar assorbire il campione per 3 min.

NOTA - In casi rari, i campioni che non riescono a passare o non fluiscono attraverso il beccuccio a filtro devono essere centrifugati ad almeno 1500 x g per 10 min. Usando una micropipetta, aggiungere 125 µL di sovrannatante nel pozzetto del campione di un nuovo dispositivo per test.

Invece del campione diluito, è possibile dispensare 2 gocce di **Controllo +** o di **Controllo -** nel pozzetto del campione per il controllo di qualità.

2. Dispensare 1 goccia di **Reagente W** (reagente di lavaggio) nel pozzetto del reagente e lasciar assorbire.
3. Dispensare 1 goccia di **Reagente 2** (rilevatore A) nel pozzetto del reagente e attendere 3 min.
4. Dispensare 1 goccia di **Reagente W** (reagente di lavaggio) nel pozzetto del reagente e lasciar assorbire.

NOTA - In caso di campioni fortemente reattivi, una linea rosa (test positivo) può apparire nella finestra del dispositivo del test prima del completamento dei punti 5 e 6.

5. Dispensare 1 goccia di **Reagente 3** (rilevatore B) nel pozzetto del reagente e attendere 3 min.
6. Dispensare 1 goccia di **Reagente W** (reagente di lavaggio) nel pozzetto del reagente e lasciar assorbire. Leggere i risultati dopo 1 min in una zona ben illuminata. L'intensità di colore e il fondo possono variare col tempo, ma i risultati possono essere interpretati anche dopo altri 10 min.

Controllo di qualità - Testare i controlli liquidi positivo (**Controllo +**) e negativo (**Controllo -**) all'apertura di ogni nuovo kit, per verificare la performance dei reagenti e del dispositivo per test. Dispensare 2 gocce di **Controllo +** o **Controllo -** nel pozzetto del campione. Lasciar assorbire per 3 min. Passare al punto 2 di "Procedura del test".

Facoltativo - Per dimostrare una reazione positiva più debole, il **Controllo +** può essere diluito con il **Reagente 1** e testato nel modo seguente.

1. Dispensare 1,5 mL di **Reagente 1** (tampone per campioni) e una goccia di **Controllo +** in una provetta. Mescolare delicatamente.
2. Dispensare 1,0 mL di **Reagente 1** (tampone per campioni) in una provetta SQ-EASY.
3. Usando una pipetta da trasferimento, trasferire 0,5 mL di **Controllo +** diluito dalla prima provetta alla provetta SQ-EASY.
4. Tappare la provetta SQ-EASY con un beccuccio a filtro. Assicurarsi che il beccuccio a filtro scatti in posizione.
5. Vortexare la provetta per 15 sec ad alta velocità. Il campione diluito è ora pronto per l'uso. Iniziare la "Procedura del test".

Ogni dispositivo **ColorPAC Toxin A** è corredato di due controlli interni. La comparsa di una linea di controllo rosa nella finestra del test (area "C") funge da controllo positivo interno che convalida la reattività immunologica del dispositivo, il corretto funzionamento del reagente di rilevazione e il rispetto della procedura appropriata. L'area della membrana (fondo) funziona da controllo negativo interno che assicura che uno sviluppo di colore non specifico non interferisca con il risultato del test.

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità del laboratorio specifico. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI in merito.

Non refertare i risultati dei test se i controlli positivo e negativo non danno risultati appropriati.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Vedere le illustrazioni sulla retrocopertina

Test positivo - Il risultato è **positivo** se nella finestra del test (area "T") appare un linea rosa di **qualsiasi intensità**. Il risultato positivo indica che la tossina A di *C. difficile* è stata rilevata nel campione testato. Nella finestra del test (area "C"), deve apparire una linea di controllo rosa di qualsiasi intensità. Alcune reazioni positive intense possono causare una riduzione di intensità della linea di controllo. L'intensità del fondo non deve oscurare la linea di controllo.

Test negativo - Il risultato è **negativo** se nella finestra del test (area "T") non appare alcuna linea rosa. Il risultato negativo indica che nel campione testato non è stata rilevata la tossina A di *C. difficile*. Nella finestra del test (area "C"), deve apparire una linea di controllo rosa di **qualsiasi intensità**. Alcuni campioni possono far assumere al fondo una colorazione scura che riduce l'intensità di colore della linea di controllo.

Come per numerosi dosaggi diagnostici eseguite su campioni fecali per la ricerca della tossina di *C. difficile*, se il risultato è negativo ma i sintomi persistono e si sospetta diarrea associata a *C. difficile*, si raccomanda di testare gli stessi campioni o campioni successivi con una metodica diversa.

Test non interpretabile - Il test **non è interpretabile** se nella finestra del test (area "C") non appare la linea di controllo rosa o se il fondo oscura la lettura della linea di controllo.

In caso di risultato non interpretabile, preparare un nuovo campione, centrifugarlo ad almeno 1500 x g per 10 min e testarlo come descritto ai punti 1 - 6 della sezione "Procedura del test". Se il campione risulta ancora interpretabile, è necessario ottenere un altro campione.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il test **ColorPAC Toxin A** non definisce la presenza di malattia associata a *C. difficile*, ma dimostra unicamente la presenza di tossina A nelle feci. Non essendo stata accertata alcuna correlazione tra il livello di tossina e la presenza o assenza della malattia, i risultati di questo test devono essere interpretati da un medico unitamente ai risultati di altre analisi di laboratorio e altri riscontri clinici.

La diagnosi di diarrea associata a *C. difficile* (CDAD) deve essere ipotizzata in qualsiasi paziente con diarrea sottoposto a terapia antibiotica nel corso dei 2 mesi precedenti e/o la cui diarrea è insorta almeno 72 h prima dell'ospedalizzazione.¹¹

Fattori quali errori tecnici o procedurali nonché la presenza nel campione fecale di altre sostanze non elencate in "Raccolta e trattamento dei campioni" possono interferire con il test e causare risultati errati.

È stato dimostrato che alcuni isolati di *Clostridium sordellii* producono una tossina emorragica (HT) avente proprietà biologiche, fisicochimiche e immunochimiche simili a quelle della tossina A. L'HT può cross-reagire nei test per la tossina A.⁴ I ceppi di *C. sordellii* con HT non sono stati rilevati in pazienti con colite e diarrea associate a terapia antibiotica.

Neonati e pazienti affetti da fibrosi cistica possono presentare la tossina di *C. difficile* nelle feci, senza che ciò abbia alcuna rilevanza clinica.^{12,13}

La performance del test **ColorPAC Toxin A** non è stata accertata nella popolazione pediatrica (<12 anni).

Gli studi di performance non sono stati condotti in ambulatori o cliniche private.

Come per altri tipi di test, il trattamento dei campioni è importante per il mantenimento dei titoli della tossina A. Se il test viene ritardato di oltre 72 h, si raccomanda di congelare i campioni ad almeno -70 °C (vedere "Raccolta e trattamento dei campioni").

VALORI ATTESI

Clostridium difficile è un opportunist che esercita i suoi effetti tossigeni quando il tratto intestinale è stato in qualche modo compromesso, come in seguito a terapia antibiotica. I pazienti sottoposti a recente terapia antibiotica o in situazioni di trattamento cronico sono pertanto i più soggetti a infezione. Stando alle stime, la percentuale di adulti sani con test positivi per citotossina nelle feci può raggiungere il 15%.^{14,15} La prevalenza di infezione da *C. difficile* in pazienti affetti da diarrea varia a seconda del tipo di istituto ospedaliero, delle prassi igienico-sanitarie e della popolazione di pazienti. Nel corso di studi clinici condotti in quattro importanti centri medici indipendenti su campioni prospettici con **ColorPAC Toxin A Test**, la prevalenza osservata in pazienti con sospetta malattia associata a *C. difficile* è risultata compresa tra 8,5% e 13,5%.¹⁶

PERFORMANCE

La performance del test **ColorPAC Toxin A** è stata determinata in valutazioni condotte in quattro importanti centri medici indipendenti, situati in aree geografiche diverse degli Stati Uniti. Sono stati complessivamente testati 598 campioni fecali freschi e 162 congelati, provenienti da pazienti con sospetta malattia associata a *C. difficile*. In ogni sito, il test **ColorPAC Toxin A** è stato comparato al dosaggio di routine della citotossina B. La percentuale di campioni che ha richiesto centrifugazione e ripetizione del test prima di dare risultati reperibili è risultata pari soltanto allo 0,1%. La Tabella 1 riassume i risultati di questa comparazione iniziale.

Tabella 1

Comparazione dei risultati di ColorPAC Toxin A con quelli del dosaggio per la citossina B

Sito	No.	ColorPAC Toxin A	Cytotoxin B Results		Intervalli di confidenza 95%
			Positivo	Negativo	
1	240	Positivo	028	006	Sensibilità 82% Specificità 97%
		Negativo	006	200	
2	135	Positivo	018	001	Sensibilità 90% Specificità 99%
		Negativo	002	114	
3	207	Positivo	021	011	Sensibilità 81% Specificità 94%
		Negativo	005	170	
4	178	Positivo	029	001	Sensibilità 74% Specificità 99%
		Negativo	010	138	
Combinati	760	Positivo	096	019	Sensibilità 81% Specificità 97%
		Negativo	023	622	

Data la mancanza di standardizzazione dei dosaggi della citotossina, i campioni discordanti sono stati sottoposti a ulteriori analisi con colture tossigene. La Tabella 2 riassume la comparazione delle discordanze tra il test **ColorPAC Toxin A** e le colture tossigene.

Tabella 2
Comparazione dei risultati di ColorPAC Toxin A con quelli del dosaggio della citotossina B con risoluzione dei campioni discordanti

Sito	No.	ColorPAC Toxin A	Risultati citotossina B	
			Positivo	Negativo
1	240	Positivo	030	004
		Negativo	005	201
2	135	Positivo	018	001
		Negativo	000	116
3	207	Positivo	022	010
		Negativo	000	175
4	178	Positivo	029	001
		Negativo	007	141
Combinati	760	Positivo	099	016
		Negativo	012	633

Come indicato in "Valori attesi", la prevalenza osservata in pazienti con sospetta malattia associata a *C. difficile* è risultata compresa tra 8,5% e 13,5% quando il test ColorPAC Toxin A è stato valutato con campioni prospettici in studi clinici in quattro importanti centri medici. La Tabella 3 illustra i valori predittivi positivi e negativi (PPV, NPV) per ogni sito in base alla prevalenza effettiva e alleaperformance riscontrata in ogni sito clinico.

Tabella 3
ColorPAC Toxin A – Valori predittivi positivi e negativi in base a prevalenza effettiva e performance

Sito	Sensibilità	Specificità	Prevalenza	VPP	VPN
1	82%	97%	8,5%	72%	98%
2	90%	99%	13,5%	93%	98%
3	81%	94%	10,2%	61%	98%
4	74%	99%	11,1%	90%	97%

Il test ColorPAC Toxin A è stato anche comparato a tre dosaggi immunoenzimatici (EIA). Ciascuno dei quattro siti di studi clinici ha testato almeno uno EIA, ColorPAC Toxin A e citotossina B per ogni campione. La Tabella 4 riassume e compara i risultati di ogni dosaggio Toxin A a quelli per la citotossina B.

Tabella 4
Comparazione combinata dei dosaggi Toxin A rispetto a citotossina B

Performance	ColorPAC Toxin A	Metodica EIA 1	Metodica EIA 2	Metodica EIA 3
Sensibilità	81%	80%	74%	86%
Specificità	97%	97%	98%	98%
Concordanza	95%	94%	94%	96%
% iniziale non interpretabile o indeterminata	0,1%	0,9%	2,4%	0%

Conferma delle colonie

E' stato condotto uno studio per valutare la performance del test ColorPAC Toxin A al fine di confermare mediante coltura la crescita di colonie sospette per ceppi produttori di tossina di *C. difficile* usando agar selettivo, agar sangue in anaerobiosi e brodo di infuso cuore-cervello (BHI). 111 isolati clinici conformi alle caratteristiche morfologiche di *C. difficile*, sono stati testati da ogni terreno usando il test ColorPAC Toxin A. Una volta identificate le colonie mediante metodiche biochimiche, è stato determinato lo stato tossigeno con un dosaggio per la citotossina B. La Tabella 5 riassume i risultati di questa comparazione iniziale.

Tabella 5
Comparazione dei risultati di ColorPAC Toxin A con quelli del dosaggio della citotossina B – Conferma delle colonie per tipo di terreno (test iniziale)

Tipo di terreno	N. di campioni	Sensibilità		Specificità	
		Intervalli di confidenza 95%		Intervalli di confidenza 95%	
Broth BHI	111	52/55	95% (84,9%, 98,8%)	52/56	93% (82,7%, 98,0%)
Agar selettivo	111	52/55	95% (84,9%, 98,8%)	52/56	93% (82,7%, 98,0%)
Agar-sangue in anaerobiosi	111	49/55	89% (77,7%, 95,9%)	53/56	95% (85,1%, 98,9%)

I risultati discordanti sono stati sottoposti a ulteriori analisi testando colonie per la produzione di Toxin A utilizzando la metodica EIA Toxin A. La Tabella 6 riassume la comparazione dei risultati discordanti di test ColorPAC Toxin A con citotossina B e la metodica Toxin A.

Tabella 6
Comparazione dei risultati di ColorPAC Toxin A con quelli del dosaggio della citossina B –
Conferma delle colonie per tipo di terreno (con risoluzione)

Tipo di terreno	N. di campioni	Sensibilità	Specificità
Brodo BHI	111	55/55	55/56
Agar selettivo	111	55/55	55/56
Agar-sangue in anaerobiosi	111	52/55	56/56

Reattività crociata - La reattività crociata del test ColorPAC Toxin A è stata valutata seminando microrganismi (cioè batteri, lieviti, virus e parassiti) in campioni fecali positivi e negativi per la tossina A a una concentrazione finale di $10^7 - 10^8$ UFC/mL per batteri e lieviti, $10^{3,2} - 10^{6,2}$ TCID₅₀/mL per virus e 10^6 parassiti/mL. Come atteso, l'unico microrganismo per cui è stata dimostrata reattività crociata nel test è un isolato altamente tossigeno di *Clostridium sordellii* (VPI 9048). Questo isolato elabora livelli elevati di tossine emorragiche e letali risultate immunologicamente e biologicamente simili alla tossina A e B C. *difficile*. Il ceppo *Staphylococcus aureus* Cowan ATCC 12598, che produce proteina A, non ha evidenziato reattività crociata. Inoltre, *Escherichia coli* ATCC 43889, 43894 e 43895, che producono tossine di tipo Shiga (SLT) non hanno evidenziato alcuna reattività crociata. I microrganismi qui elencati non hanno dato risultati falsamente positivi in feci negative per la tossina A o falsamente negativi in feci positive per la tossina A.

Microrganismi (n. ceppi testati)		
<i>Adenovirus</i> , tipo 2, 40, 41 (3)	<i>Clostridium perfringens</i> (1)	<i>Giardia intestinalis</i> (1)
<i>Aeromonas hydrophilia</i> (1)	<i>Clostridium septicum</i> (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)
<i>Bacillus cereus</i> (1)	<i>Clostridium sordellii</i> , VPI 9048 (1)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1)
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	<i>Clostridium sporogenes</i> (1)	<i>Proteus mirabilis</i> (1)
<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	<i>Clostridium subterminale</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)
<i>Campylobacter coli</i> (1)	<i>Clostridium tetani</i> (1)	<i>Rotavirus</i> , umana (1)
<i>Campylobacter fetus</i> (1)	<i>Coxsackie virus</i> , B1 (1)	<i>Salmonella choleraesuis</i> (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	<i>Cytomegalovirus</i> (1)	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
<i>Campylobacter laridis</i> (1)	<i>Echovirus</i> , tipo 22 (1)	<i>Shigella flexneri</i> (1)
<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Entamoeba histolytica</i> (1)	<i>Shigella sonnei</i> (1)
<i>Clostridium botulinum</i> , tipo A (1)	<i>Enterococcus faecalis</i> , ATCC 29212 (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 12598
<i>Clostridium butyricum</i> (1)	<i>Enterococcus faecium</i> , ATCC 51559	(Cowan) (1)
<i>Clostridium histolyticum</i> (1)	(resistente alla vancomicina) (1)	<i>Vibrio cholerae</i> (1)
<i>Clostridium innocuum</i> (1)	<i>Enterovirus</i> , tipo 69 (1)	<i>Vibrio parahemolyticus</i> (1)
<i>Clostridium novyi</i> (1)	<i>Escherichia coli</i> (4)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)

Limite di rilevazione

La sensibilità di analisi del test ColorPAC Toxin A è stata valutata seminando concentrazioni conosciute di tossina A in cinque campioni, ciascuno costituito da feci liquide, semisolide e solide. I campioni così seminati sono stati testati in triplicato. La Tabella 7 riassume i risultati.

Tabella 7
Limite di rilevazione per tipo di feci

Matrice seminata con tossina A	Range limite di rilevazione (ng/mL)
Feci liquide	1,38 – 5,21
Feci semisolide	1,61 – 18,71
Feci solide	3,19 – 22,58

Riproducibilità del test

La riproducibilità del test ColorPAC Toxin A è stata valutata in numerosi laboratori clinici testando pannelli di feci costituiti da tre livelli di tossina A e un controllo antigenico negativo per la tossina A. I campioni in cieco sono stati testati in triplicato ogni giorno, per tre giorni, in tutti e quattro i diversi siti di studi clinici. ColorPAC Toxin A ha dimostrato una riproducibilità interna e tra test del 100%.

DISPONIBILITÀ

N. di cat. Descrizione
 274030 ColorPAC Toxin A, C.*difficile*, 30 kit di test

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.



BD ColorPAC Toxin A

Español

USO PREVISTO

La prueba **ColorPAC Toxin A** es un análisis cromatográfico rápido para la detección cualitativa de toxina A de *Clostridium difficile* (enterotoxina) en muestras fecales de pacientes con sospecha de enfermedad asociada a *C. difficile*. La prueba también puede usarse para la confirmación de colonias presuntas de *C. difficile* toxígeno obtenidas de placas de agar o caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI). Este análisis ha sido diseñado para usarse como una ayuda en el diagnóstico de la enfermedad asociada a *C. difficile*.

RESUMEN Y EXPLICACION

C. difficile es una causa importante de la diarrea asociada a antibióticos, que en su forma más grave puede dar lugar al síndrome clínico de colitis pseudomembranosa, que conlleva una mortalidad significativa. Pese a que *C. difficile* puede ser un componente de la flora bacteriana intestinal normal, puede convertirse en un patógeno oportunista después del tratamiento del paciente con antibióticos, debido a la alteración que éstos producen en la flora intestinal normal. En las circunstancias apropiadas, las cepas productoras de toxina de *C. difficile* producen dos toxinas: la toxina A, una enterotoxina histopática y la toxina B, una citotoxina in vitro¹. La literatura indica que la toxina A y la toxina B son producidas al mismo tiempo². Se piensa que los síntomas clínicos asociados con la enfermedad se deben sobre todo a la toxina A y, hasta la fecha, no se han encontrado pruebas convincentes de que la toxina B tenga actividad biológica importante en la enfermedad de presentación natural³.

Las técnicas diagnósticas clínicas más comunes para la colitis por *C. difficile* asociada a antibióticos han sido los análisis de citotoxicidad (ACT) en cultivo celular, la aglutinación de látex (AL) y el enzimoimmunoanálisis (EIA)⁴. El ACT detecta la toxina B mediante su efecto citopático sobre cultivos celulares y precisa de uno a dos días para completarse. La aglutinación de látex detecta los antígenos de *C. difficile* (y no las toxinas específicas) pero se considera un análisis rápido y valioso para determinar si el *C. difficile* juega un papel etiológico en pacientes con diarrea⁵. El enzimoimmunoanálisis en micropocillo puede detectar la toxina A o, en algunos casos, la toxina A y la toxina B simultáneamente⁶.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba **ColorPAC Toxin A** está formada por un anticuerpo de captación de la toxina A de *C. difficile* inmovilizado en una tira de análisis cromatográfico envasado en un dispositivo de análisis. Una muestra (es decir, fecal, colonias o caldo BHI) es diluida con el tampón para la muestra y se añade al pocillo de muestra del dispositivo de análisis. La muestra diluida se absorbe por la tira de análisis por efecto capilar. La toxina A, si está presente, se une al anticuerpo de captación situado en la línea de prueba cuando la muestra es absorbida por la tira de análisis. Se añade el reactivo de lavado y los restantes reactivos al pocillo de reactivo del dispositivo de análisis.

Al añadir el Detector A, los liposomas recubiertos de anticuerpos de toxina A, que contienen un colorante rosa, atraviesan la tira de análisis y se unen al antígeno de toxina A de *C. difficile* que se unió a la tira de análisis en el paso anterior. La formación de color es mejorada por la adición de un segundo reactivo liposómico, el Detector B, que se une al complejo formado entre el Detector A y el antígeno de la muestra que está en la línea de prueba. Después del último lavado, se efectúa una lectura visual de las reacciones. Si se detecta el antígeno de toxina A en la muestra, aparecerán una línea de prueba de color rosa y una línea de control de color rosa, lo que indica un resultado positivo. Si la toxina A está ausente, sólo aparece la línea de control de color rosa, lo que indica un resultado negativo.

REACTIVOS

ColorPAC Toxin A Test Kit:

Reactivo 1	(30,0 mL)	Tampón para muestra: Solución salina tamponada con un agente mucolítico, detergente al 1%.
Reactivo 2	(1,5 mL)	Detector A: Liposomas recubiertos de anticuerpos de conejo de toxina A de <i>C. difficile</i> .
Reactivo 3	(1,5 mL)	Detector B: Liposomas recubiertos de anticuerpos de conejo específicos para el Detector A.
Reactivo W	(2,3 mL)	Reactivo de lavado: Solución salina tamponada con estabilizador de proteína bovina, detergente al 0,1%.
Control +	(1,0 mL)	Control positivo: Solución salina tamponada con estabilizador de proteína bovina, toxina A desactivada de <i>C. difficile</i> .
Control -	(1,0 mL)	Control negativo: Solución salina tamponada con estabilizador de proteína bovina. Cada reactivo y control contiene azida sódica al 0,2% (conservante).
30 Dispositivos de análisis		Cada uno contiene una tira de análisis recubierta de anticuerpos monoclonales de toxina A de <i>C. difficile</i> y toxina A de <i>C. difficile</i> .
30 tubos SQ-EASY y puntas con filtro.		
30 aplicadores y 30 pipetas de transferencia.		
1 varilla (dropper)		

Advertencias y precauciones:

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: A la recepción del equipo, refrigerarlo o sacar la caja de los reactivos que precisan refrigeración y almacenarla a 2 – 8 °C. NO CONGELAR. Los reactivos deben cerrarse inmediatamente con tapón y refrigerarse cuando no se usen, teniendo cuidado de no intercambiar los tapones codificados por color. No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad. Después de sacarlos del frigorífico, dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de usarlos. Evitar la exposición prolongada de los reactivos a la luz fuerte.

No intercambiar, mezclar ni combinar los reactivos y dispositivos pertenecientes a lotes diferentes del equipo.

Para asegurar la dispensación adecuada de las gotas, se debe sostener el frasco dispensador de reactivo en posición vertical y dejar caer las gotas una por una.

Advertencia: Los reactivos contienen azida sódica. Muy tóxico por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel. El contacto con ácidos libera un gas muy tóxico. En caso de contacto con la piel, lavarla inmediatamente con abundante agua. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre, formando azidas metálicas muy explosivas. Al desechar el material, utilizar un gran volumen de agua para evitar el depósito de azidas.

Dispositivos de análisis: No extraer el dispositivo de análisis de la bolsa hasta justo antes de usarse. Almacenar los dispositivos sin abrir a temperatura ambiente (15 – 30 °C) o en frigorífico (2 – 8 °C) si se desea. No deben exponerse los dispositivos sin utilizar a cambios repetidos de temperatura de refrigeración y ambiental. Para un solo uso; no utilizar de nuevo.

Controles: No utilizar el equipo si los controles positivo y negativo no producen los resultados adecuados. El control positivo se hace con toxina A desactivada de *C. difficile*, que debe ser manipulada como un material potencialmente peligroso.

Pipetas de transferencia: Para un solo uso; no utilizar de nuevo.

Puntas con filtro: La punta debe contener material de filtro blanco para asegurar la realización correcta de la prueba. Para un solo uso; no utilizar de nuevo. Asegurarse de colocar correctamente la punta con filtro, con el reborde superior de la punta con filtro al mismo nivel que la parte superior del tubo SQ-EASY.

Advertencia: En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales deben seguirse las "Precauciones estándar"⁷⁻¹⁰ y las directrices del centro.

Desechar todos los materiales utilizados en el proceso en un recipiente aprobado para desechos biológicamente peligrosos. Las muestras pueden esterilizarse en autoclave durante 60 min a 121 °C o por tratamiento con una solución de hipoclorito sódico de 0,05% (dilución 1:100 de lejía doméstica) durante 30 min. *No esterilizar en autoclave materiales que contengan hipoclorito sódico.*

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recoger las muestras fecales en un recipiente limpio y hermético sin conservante. El análisis de las muestras debe realizarse lo antes posible después de recibirlas en el laboratorio; no obstante pueden ser almacenadas hasta 72 h a 2 – 8 °C después de recibirse en el laboratorio. Si el análisis de las muestras se aplaza más de 72 h, se recomienda congelar inmediatamente las muestras a -70 °C después de recibirse en el laboratorio. Las muestras pueden congelarse hasta 2 meses. Las muestras positivas presentan poca o ninguna reducción de la toxina A detectada por ColorPAC Toxin A después de tres ciclos de congelación y descongelación.

Dejar que las muestras fecales alcancen la temperatura ambiente y mezclarlas bien antes de usarlas.

Los resultados de la prueba ColorPAC Toxin A no se ven afectadas por ampicilina, cefalexina, metronidazol, vancomicina, sulfato de bario, laxantes, sangre y medicamentos antidiarreicos que puedan estar presentes en las heces.

Se recomienda analizar *C. difficile* o sus toxinas en las muestras fecales diarreicas (blandas)⁷.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: Todos los materiales se relacionan bajo el epígrafe "Reactivos."

Materiales necesarios pero no suministrados: Mezclador vórtex y cronómetro, micropipeta; (optativo: el caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) o el agar selectivo para *C. difficile* se necesitan sólo para la detección de toxina A en aislados de cultivos de *C. difficile*, centrifugador con capacidad de 1500 x g, vea "Procedimiento de análisis", punto 1).

Realización de la prueba: Volver a leer "Precauciones" y "Recogida y preparación de las muestras" antes de efectuar las pruebas. El área de prueba, los reactivos, las muestras a analizar y los componentes de la prueba deben estar a temperatura ambiente antes de realizar la prueba.

Mezclar suavemente todos los reactivos invirtiéndolos varias veces antes de utilizarlos. Evitar generar espuma.

PREPARACION DE LA MUESTRA FECAL: Consultar las figuras de la portada posterior

1. Con una micropipeta o la varilla (dropper) suministrada, añadir 1 mL de **Reactivo 1** (tampón para muestra) a un tubo SQ-EASY para cada muestra de prueba.
2. Mezclar bien la muestra fecal. Para las heces líquidas o semilíquidas, extraer una muestra de 0,5 mL e introducirla en el tubo que contiene el **Reactivo 1** utilizando la pipeta de transferencia suministrada. Para las heces sólidas, utilizar un aplicador o una espátula de madera suministrada para obtener dos muestras del tamaño de un guisante (0,5 g) de diferentes áreas de la muestra y transferirlas al tubo que contiene el **Reactivo 1**. Cierre el tubo con un tapón con punta con filtro antes de agitar en el vórtex.
3. Agitar el tubo en un vórtex durante 15 sec a alta velocidad. La muestra diluida está lista para utilizarse. Seguir en "Procedimiento de análisis".

PREPARACION DE MUESTRAS DE COLONIAS Y CALDO BHI (optativa)

Análisis de toxina A en cultivos de placas de medio:

1. Localizar las colonias presuntas en la superficie del agar de los cultivos de 42 – 48 h que cumplen las características morfológicas y de la tinción de Gram de *C. difficile*.
2. Con una micropipeta o varilla (dropper) suministrada, añadir 1 mL de **Reactivo 1** (tampón para muestra) a un tubo de cultivo de 12 x 75 mm. Transferir asépticamente una cantidad suficiente de colonias presuntas aisladas para lograr una turbidez equivalente al patrón McFarland de 2,0.
3. Realizar una comparación ocular de la suspensión bacteriana para lograr una suspensión bacteriana equivalente al patrón McFarland de 2,0. Utilizar el **Reactivo 1** para ajustar la turbidez al patrón McFarland de 2,0 si es necesario.
4. Agitar el tubo en un vórtex durante 15 sec a alta velocidad. La muestra diluida está lista para utilizarse.
5. Seguir en "Procedimiento de análisis".

Análisis de toxina A en caldo BHI:

1. Con una micropipeta o varilla (dropper) suministrada, añadir 1 mL de **Reactivo 1** (tampón para muestra) a un tubo SQ-EASY.
2. Añadir 0,5 mL de caldo BHI de 72 h que contiene un cultivo presunto de *C. difficile*. Cerrar el tubo con un tapón con punta con filtro antes de agitar en el vórtex.
3. Agitar el tubo en un vórtex durante 15 sec a alta velocidad. La muestra diluida está lista para utilizarse.
4. Seguir en "Procedimiento de análisis".

Consultar las figuras de la portada posterior

Procedimiento de análisis:

Abrir el mismo número de dispositivos de análisis como las muestras y controles a analizar.

1. Añadir 3 gotas de la muestra diluida (125 µL) al pocillo de muestra de un dispositivo de análisis. Esperar 3 min para que se absorba la muestra.

NOTA: En raras ocasiones, las muestras que no atraviesen la punta con filtro precisarán centrifugación a 1500 x g durante 10 min. Utilizando una micropipeta, dispensar 125 µL del líquido sobrenadante en el pocillo de muestra de un nuevo dispositivo de análisis.

En lugar de la muestra diluida, pueden añadirse 2 gotas de **Control +** o de **Control -** al pocillo de muestra para control de calidad.

2. Añadir 1 gota de **Reactivo W** (Reactivo de lavado) al pocillo de reactivo y esperar que se absorba.
3. Añadir 1 gota de **Reactivo 2** (Detector A) al pocillo de reactivo y esperar 3 min.
4. Añadir 1 gota de **Reactivo W** (Reactivo de lavado) al pocillo de reactivo y esperar a que se absorba.

NOTA: En las muestras fuertemente reactivas, puede aparecer una línea rosa de prueba (positiva) en la ventana del dispositivo de análisis antes de completar los pasos 5 y 6.

5. Añadir 1 gota de **Reactivo 3** (Detector B) al pocillo de reactivo y esperar 3 min.
6. Añadir 1 gota de **Reactivo W** (Reactivo de lavado) al pocillo de reactivo y esperar a que se absorba. Leer los resultados después de 1 min en un lugar bien iluminado. La intensidad del color y del fondo pueden cambiar con el tiempo, pero los resultados pueden interpretarse durante 10 min más.

Control de calidad: Los controles líquidos (**Control +** y **Control -**) deben ser analizados cuando se abra un equipo nuevo para verificar el rendimiento de los reactivos y del dispositivo de análisis. Añadir 2 gotas del **Control +** o **Control -** al pocillo de la muestra. Permitir que se absorba durante 3 min. Seguir en el paso 2 del "Procedimiento de análisis".

Optativo: La dilución del **Control +** con el **Reactivo 1** puede ser realizada y analizada para demostrar una reacción positiva más débil de la manera siguiente.

1. Añadir 1,5 mL de **Reactivo 1** (tampón para muestra) y dejar caer una gota de **Control +** a un tubo de ensayo. Mezclar suavemente.
2. Añadir 1,0 mL de **Reactivo 1** (tampón para muestra) a un tubo SQ-EASY.
3. Utilizando una pipeta de transferencia, transferir 0,5 mL de **Control +** diluido del primer tubo al tubo SQ-EASY.
4. Cerrar el tubo SQ-EASY con una punta con filtro. Asegurarse de que el filtro se coloque correctamente.
5. Agitar el tubo en un vórtex durante 15 sec a alta velocidad. La muestra diluida está lista para utilizarse. Seguir en "Procedimiento de análisis".

El dispositivo **ColorPAC Toxin A** contiene dos controles incorporados. La aparición de una línea rosa en la ventana del análisis (área "C") es un control positivo interno que valida la reactividad inmunológica del dispositivo y el funcionamiento adecuado del reactivo de detección, y confirma que el procedimiento seguido es correcto. El área de la membrana (fondo) funciona como el control negativo interno para asegurar que el desarrollo inespecífico de color no interfiera con el resultado del análisis.

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de CLSI y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

Los resultados del paciente no deben ser notificados si los controles positivo y negativo no dan los resultados apropiados.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Consultar las figuras de la portada posterior

Prueba positiva: Un resultado es **positivo** si aparece una línea rosa de prueba de cualquier intensidad en la ventana del análisis (área "T"). Un resultado de prueba positiva indica que se ha detectado toxina A de *C. difficile* en la muestra del paciente. Una línea rosa de control de cualquier intensidad debe aparecer en la ventana del análisis (área "C"). Algunas reacciones intensamente positivas pueden reducir la intensidad de la línea de control. La intensidad del fondo no debe ocultar la línea de control.

Prueba negativa: Un resultado es **negativo** si no hay ninguna línea de prueba visible en la ventana del análisis (área "T"). Un resultado de análisis negativo indica que no se ha detectado toxina A de *C. difficile* en la muestra del paciente. Una línea rosa de control de cualquier intensidad debe aparecer en la ventana del análisis (área "C"). Algunas muestras de paciente pueden producir un fondo oscuro, que reduce la intensidad de la línea de control.

Lo mismo que con muchos análisis de diagnóstico de muestras fecales realizados para detectar la toxina de *C. difficile*, si el resultado es negativo y los síntomas persisten y se sospecha diarrea asociada a *C. difficile*, se recomienda repetir el análisis de la misma muestra fecal o de muestras posteriores utilizando otra metodología.

Prueba no interpretable: El resultado es **no interpretable** si no hay ninguna línea rosa de control en la ventana del análisis (área "C") o si el fondo oculta la lectura de la línea de control.

Si el resultado es no interpretable, se debe preparar una nueva muestra, centrifugarla a un mínimo de 1500 x g durante 10 min y analizarla del modo descrito en los pasos 1 a 6 del "Procedimiento de análisis". Si la muestra permanece no interpretable, se debe solicitar una muestra nueva.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La prueba **ColorPAC Toxin A** no define la presencia de enfermedad asociada a *C. difficile* sino demuestra solamente la presencia de toxina A en heces. No se ha demostrado que el nivel de toxina esté correlacionado con la presencia o ausencia de enfermedad del paciente. Estos resultados de análisis deben ser interpretados por un médico conjuntamente con los otros hallazgos de laboratorio y los datos clínicos del paciente.

El diagnóstico de diarrea asociada a *C. difficile* (DADC) debe sospecharse ante cualquier paciente con diarrea que haya recibido antibióticos en los 2 meses anteriores y/o cuya diarrea empezó 72 h o más después de su hospitalización¹¹.

Factores tales como errores técnicos o de procedimiento, además de la presencia de otras sustancias en la muestra fecal que no se enumeran en "Recogida y manipulación de las muestras", pueden interferir con la prueba y producir resultados erróneos.

Se ha demostrado que algunos aislados de *Clostridium sordellii* producen una toxina hemorrágica (TH) que tiene propiedades biológicas, fisicoquímicas e inmunológicas similares a las de la toxina A. La TH puede producir reacciones cruzadas en las pruebas de toxina A⁴. Las cepas TH de *C. sordellii* no han sido detectadas en pacientes que tienen diarrea y colitis asociadas a antibióticos.

Los lactantes y los pacientes que tienen fibrosis quística pueden tener toxina de *C. difficile* en las heces sin que esto tenga ningún significado clínico^{12,13}.

Las características del rendimiento de la prueba **ColorPAC Toxin A** no han sido establecidas en una población pediátrica (<12 años).

No se han realizado estudios de rendimiento en un laboratorio de consulta o en el entorno de punto de atención.

Al igual que con los análisis de otras marcas, la manipulación de las muestras es importante para el mantenimiento de los títulos de toxina A. Si el análisis se aplaza más de 72 h, se recomienda congelar las muestras a -70 °C (vea "Recogida y manipulación de las muestras").

VALORES PREVISTOS

Clostridium difficile es un patógeno oportunista que ejerce sus efectos toxigénicos cuando el intestino se encuentra afectado, por ejemplo por la terapia antibiótica. Por lo tanto, los pacientes que han recibido terapia con antibióticos recientemente o que están en situación de atención crónica son los que más a menudo se infectan. Los cálculos indican que hasta el 15% de los adultos sanos puede tener pruebas de citotoxina fecal positivas^{14,15}. La prevalencia de la infección por *C. difficile* en pacientes con diarrea varía de acuerdo con el tipo de centro, la limpieza y la población de pacientes. Se encontraron frecuencias de prevalencia del 8,5% al 13,5% en pacientes con sospecha de enfermedad asociada a *C. difficile* cuando la prueba **ColorPAC Toxin A** fue evaluada con muestras prospectivas en estudios clínicos realizados en cuatro centros médicos independientes importantes¹⁶.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento de la prueba **ColorPAC Toxin A** ha sido determinado en evaluaciones realizadas en cuatro centros médicos independientes importantes. Los centros estaban situados en diferentes áreas geográficas de Estados Unidos. Se analizó un total de 598 muestras fecales recientes y 162 muestras fecales congeladas obtenidas de pacientes sintomáticos con sospecha de enfermedad asociada a *C. difficile*. En cada centro se comparó el análisis de citotoxina B habitual con la prueba **ColorPAC Toxin A**. Sólo el 0,1% de las muestras fecales precisó centrifugación y la repetición del análisis antes de poder obtener un resultado de informe. Los resultados de esta comparación inicial se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1
Comparación de resultados: ColorPAC Toxin A frente a citotoxina B

Centro	N.º	ColorPAC Toxin A	Resultados de Citotoxina B		Intervalos de confianza 95%
			Positivo	Negativo	
1	240	Positivo	028	006	Sensibilidad 82% Especificidad 97%
		Negativo	006	200	
2	135	Positivo	018	001	Sensibilidad 90% Especificidad 99%
		Negativo	002	114	
3	207	Positivo	021	011	Sensibilidad 81% Especificidad 94%
		Negativo	005	170	
4	178	Positivo	029	001	Sensibilidad 74% Especificidad 99%
		Negativo	010	138	
Combinado	760	Positivo	096	019	Sensibilidad 81% Especificidad 97%
		Negativo	023	622	

Debido a la ausencia de normas publicadas para los análisis de citotoxinas, las muestras que se mantenían discordantes fueron investigadas también mediante un cultivo toxigénico. La comparación entre los resultados discordantes con ColorPAC Toxin A y el cultivo toxigénico se resume en la Tabla 2.

Tabla 2
Comparación de resultados: ColorPAC Toxin A frente a citotoxina B con resolución de muestras discordantes

Centro	N.º	ColorPAC Toxin A	Resultados de Citotoxina B	
			Positivo	Negativo
1	240	Positivo	030	004
		Negativo	005	201
2	135	Positivo	018	001
		Negativo	000	116
3	207	Positivo	022	010
		Negativo	000	175
4	178	Positivo	029	001
		Negativo	007	141
Combinado	760	Positivo	099	016
		Negativo	012	633

Como se indica en "Valores previstos", las frecuencias de prevalencia fueron del 8,5% al 13,5% en pacientes con sospecha de enfermedad asociada a *C. difficile* cuando la prueba ColorPAC Toxin A fue evaluada utilizando muestras prospectivas en estudios clínicos realizados en cuatro centros médicos independientes importantes. Los valores predictivos positivo y negativo (VPP, VPN) obtenidos en cada lugar se muestran en la Tabla 3 y se fundamentan en los valores reales de prevalencia y rendimiento obtenidos en cada centro clínico.

Tabla 3
ColorPAC Toxin A: Valores diagnósticos de resultados positivos y negativos basados en características de prevalencia y rendimiento reales

Centro	Sensibilidad	Especificidad	Prevalencia	VPP	VPN
1	82%	97%	8,5%	72%	98%
2	90%	99%	13,5%	93%	98%
3	81%	94%	10,2%	61%	98%
4	74%	99%	11,1%	90%	97%

La prueba ColorPAC Toxin A también fue comparada con tres enzoinmunoanálisis (EIA). En cada uno de los cuatro centros del estudio clínico fue analizado al menos un EIA, ColorPAC Toxin A y citotoxina B para cada muestra. Los resultados de cada análisis de toxina A fueron comparados con los resultados de citotoxina B y se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4
Comparación de los resultados en todos los centros: Análisis de toxina A frente a citotoxina B

Rendimiento	ColorPAC Toxin A	Método 1 EIA	Método 2 EIA	Método 3 EIA
Sensibilidad	81%	80%	74%	86%
Especificidad	97%	97%	98%	98%
Concordancia	95%	94%	94%	96%
% Inicial no interpretable o indeterminado	0,1%	0,9%	2,4%	0%

Confirmación de colonias

Se hizo un estudio para evaluar el rendimiento de la prueba ColorPAC Toxin A con el fin de proporcionar confirmación de los cultivos de colonias sospechosas de contener cepas de *C. difficile* productoras de toxina utilizando agar selectivo, agar sangre anaerobio y caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI). Un total de 111 aislados clínicos que cumplieron las características morfológicas de *C. difficile* fueron analizados en cada uno de estos medios utilizando la prueba ColorPAC Toxin A. Después de identificar las colonias utilizando métodos bioquímicos, su estado toxigénico fue determinado por un análisis de citotoxina B. Los resultados de esta comparación inicial se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5
Comparación de resultados de ColorPAC Toxin A frente a resultados de citotoxina B:
Confirmación de colonias por tipo de medio (análisis inicial)

Tipo de medio	Cant. de muestras	Sensibilidad		Especificidad	
		95% Intervalos de confianza		95% Intervalos de confianza	
Caldo BHI	111	52/55	95% (84,9%; 98,8%)	52/56	93% (82,7%; 98,0%)
Agar selectivo	111	52/55	95% (84,9%; 98,8%)	52/56	93% (82,7%; 98,0%)
Agar sangre anaerobio	111	49/55	89% (77,7%; 95,9%)	53/56	95% (85,1%; 98,9%)

Los resultados discordantes fueron investigados también mediante el análisis de la producción de toxina A por las colonias utilizando un método EIA de detección de la toxina A. La comparación de los resultados discordantes por ColorPAC Toxin A frente a los resultados de citotoxina B y un método de toxina A se resume en la Tabla 6.

Tabla 6
Comparación de los resultados de ColorPAC Toxin A frente a los resultados de citotoxina B:
Confirmación de colonias por tipo de medio (con resolución)

Tipo de medio	Cant. de muestras	Sensibilidad	Especificidad
Caldo BHI	111	55/55	55/56
Agar selectivo	111	55/55	55/56
Agar sangre anaerobio	111	52/55	56/56

Reactividad cruzada: La prueba ColorPAC Toxin A fue evaluada respecto de su reactividad cruzada mediante la siembra de microorganismos (es decir, bacterias, levaduras, virus y parásitos) en muestras fecales toxina A positivas y toxina A negativas con una concentración final de $10^7 - 10^8$ UFC/mL de las bacterias y levaduras, $10^{3,2} - 10^{6,2}$ TCID₅₀/mL de los virus y 10^6 parásitos/mL. Como se esperaba, el único organismo que demostró una reacción cruzada en el estudio fue un aislado altamente toxigénico de *Clostridium sordellii* (VPI 9048). Este aislado elabora niveles elevados de toxinas hemorrágicas y letales que han demostrado tener similitud inmunológica y biológica con las toxinas A y B de *C. difficile*. El *Staphylococcus aureus* cepa Cowan ATCC 12598, que produce proteína A, no presentó reactividad cruzada. Por otro lado, las *Escherichia coli* ATCC 43889 43894 y 43895, que producen toxinas de tipo Shiga (TTS), no presentaron ninguna reactividad cruzada. Los microorganismos siguientes no produjeron resultados falsos positivos en muestras fecales negativas para toxina A ni resultados falsos negativos en muestras fecales positivas para toxina A.

Microorganismos (n° de cepas analizadas)		
<i>Adenovirus</i> , tipos 2, 40, 41 (3)	<i>Clostridium perfringens</i> (1)	<i>Giardia intestinalis</i> (1)
<i>Aeromonas hydrophilia</i> (1)	<i>Clostridium septicum</i> (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)
<i>Bacillus cereus</i> (1)	<i>Clostridium sordellii</i> , VPI 9048 (1)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1)
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	<i>Clostridium sporogenes</i> (1)	<i>Proteus mirabilis</i> (1)
<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	<i>Clostridium subterminale</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)
<i>Campylobacter coli</i> (1)	<i>Clostridium tetani</i> (1)	<i>Rotavirus</i> , humano (1)
<i>Campylobacter fetus</i> (1)	<i>Coxsackie virus</i> , B1 (1)	<i>Salmonella choleraesuis</i> (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	<i>Cytomegalovirus</i> (1)	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
<i>Campylobacter laridis</i> (1)	<i>Echovirus</i> , tipo 22 (1)	<i>Shigella flexneri</i> (1)
<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Entamoeba histolytica</i> (1)	<i>Shigella sonnei</i> (1)
<i>Clostridium botulinum</i> , tipo A (1)	<i>Enterococcus faecalis</i> , ATCC 29212 (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 12598 (Cowan) (1)
<i>Clostridium butyricum</i> (1)	<i>Enterococcus faecium</i> , ATCC 51559 (resistente a vancomicina) (1)	<i>Vibrio cholerae</i> (1)
<i>Clostridium histolyticum</i> (1)	<i>Enterovirus</i> , tipo 69 (1)	<i>Vibrio parahemolyticus</i> (1)
<i>Clostridium innocuum</i> (1)	<i>Escherichia coli</i> (4)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)
<i>Clostridium novyi</i> (1)		

Límite de detección

La sensibilidad analítica de la prueba ColorPAC Toxin A fue evaluada mediante la siembra de concentraciones conocidas de toxina A en cinco muestras de cada tipo de heces, líquidas, semilíquidas y sólidas. Las muestras sembradas fueron analizadas por triplicado. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7
Límite de detección por tipo de muestra fecal

Matriz sembrada de toxina A	Intervalo LDD (ng/mL)
Muestra fecal líquida	1,38 – 5,21
Muestra fecal semilíquida	1,61 – 18,71
Muestra fecal sólida	3,19 – 22,58

Reproducibilidad del análisis

La reproducibilidad de la prueba ColorPAC Toxin A fue evaluada en varios laboratorios clínicos mediante análisis de paneles que consistían de tres niveles de toxina A y un control antigénico de toxina A negativo. Se analizaron por triplicado muestras anónimas a diario durante tres días en cada uno de los cuatro lugares diferentes del estudio clínico. ColorPAC Toxin A demostró una reproducibilidad intraanalítica e interanalítica del 100%.

DISPONIBILIDAD

N.º ref. Descripción
274030 ColorPAC Toxin A, *C. difficile*, 30 equipos de pruebas.

REFERENCIAS: Véase la sección "References" en el texto inglés.



Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare



Use by / Spotřebujte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použite do / Usar antes de / Använd före /
 YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) /
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) /
 AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp) /
 VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) /
 AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /
 ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) /
 AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mensesio pabaiga) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) /
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiac) /
 aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden)



Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalogové číslo / Número de catálogo



Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autoriseret representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Representante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU



In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaite / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietaisais / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicínsk anordning för in vitro-diagnostik



Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperatuurlimiet / Temperatuuri piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturbereich / Όριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrænsning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenie teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning



Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch kode (Lot) / Chargennummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kode (Serie) / Kod partii (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti)



Contains sufficient for <n> tests / Dostatečné množství pro <n> testů / Indeholder tilstrækkeligt til <n> test / Voldoende voor <n> tests / Küllaldane <n> testide jaoks / Sisältöön riittävä <n> testejä varten / Contenu suffisant pour <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα <n> εξετάσεις / <n> teszthez elegendő / Contenido suficiente per <n> test / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Innholder tilstrekkelig for <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Contém suficiente para <n> testes / Obsah vystačí na <n> testov / Contenido suficiente para <n> pruebas / Räckertill <n> antal tester



Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeada kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen

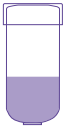


Positive control / Pozitivní kontrola / Positiv kontrol / Positieve controle / Positiivne kontroll / Positivkontroll / Contrôle positif / Positive Kontrolle / θετικός έλεγχος / Pozitiv kontroll / Controllo positivo / Teigiama kontrolė / Positiv kontroll / Kontrola dodatnia / Controllo positivo / Pozitivna kontrola / Control positivo


BD ColorPAC™ Toxin A

STOOL SPECIMEN PREPARATION / Preparation des échantillons de selles / Vorbereitung der Stuhlproben / Preparazione dei campioni fecali / Preparación de las muestras fecales

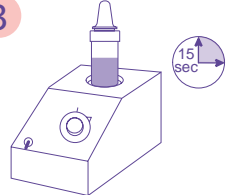
1 Add 1 mL Sample Buffer to tube. / Ajouter 1 mL de Tampón d'échantillon au tube. / 1 mL Probenpuffer in das Röhrchen geben. / Dispensare nella provetta 1 mL di tampone Campione.ta / Añadir 1 mL de Tampón de muestra al tubo.



2 Add mixed stool: 0.5 mL liquid or 2 Pea-sized samples. Cap tube. / Ajouter les selles mélangées : 0,5 mL de liquide ou 2 échantillons de la taille d'un pois. Mettre le bouchon sur le tube. / Gemischte Stuhlprobe zugeben: 0,5 mL flüssige Stuhlprobe oder 2 erbsengroße feste Stuhlproben. Röhrchen verschließen. / Aggiungere la feci miscelate: 0,5 mL di liquido o 2 campioni delle dimensioni di un pisello. Chiudere la provetta. / Añadir heces mezcladas: 0,5 mL líquido o 2 muestras del tamaño de un guisante. Tapone el tubo.



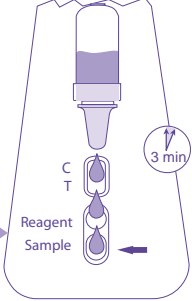
3



Vortex 15 sec. / Agiter au vortex pendant 15 sec. / 15 sec im Vortex-Mixer mischen. / Agitare con vortex per 15 sec. / Agite en un agitador vórtex 15 sec.

ASSAY PROCEDURE / Procédure de test / Assayverfahren / Procedura dal test / Procedimiento de analisis

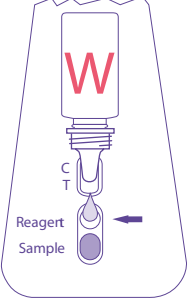
1



Reagent
Réactifs
Reagenz
Reagente
Reactivo
Sample
Echantillon
Probe
Campione
Muestra

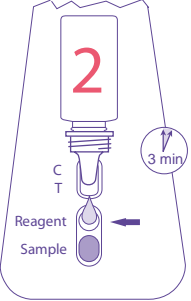
Add 3 drops Sample to sample well. Allow sample to absorb for 3 min. / Ajouter 3 gouttes d'échantillon au puits de l'échantillon. Laisser l'échantillon s'absorber pendant 3 min. / 3 Tropfen Probenmaterial in die Probenvertiefung geben. Probe 3 min absorbieren lassen. / Dispensare 3 gocce di Campione nel pozzetto per reagente. Lasciar assorbire il campione per 3 min. / Añadir 3 gotas de Muestra al pocillo de muestra. Espere 3 min. a que se absorba la muestra.

2



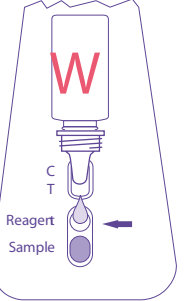
Add 1 drop Reagent W to reagent well. Wait to absorb. / Ajouter 1 goutte de Réactif W au puits du réactif. Laisser absorber. / 1 Tropfen Reagenz W in die Reagenzvertiefung geben. Absorbieren lassen. / Dispensare 1 goccia di Reagente W nel pozzetto per reagente. Lasciar assorbire. / Añadir 1 gota de Reactivo W al pocillo de reactivo. Espere que se absorba.

3



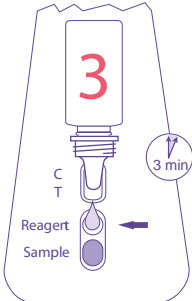
Add 1 drop Reagent 2 to reagent well. Wait 3 min. / Ajouter 1 goutte de Réactif 2 au puits du réactif. Attendre 3 min. / 1 Tropfen Reagenz 2 in die Reagenzvertiefung geben. 3 min warten. / Dispensare 1 goccia di Reagente 2 nel pozzetto per reagente. Aspettare 3 min. / Añadir a 1 gota de Reactivo 2 al pocillo de reactivo. Espere 3 min.

4



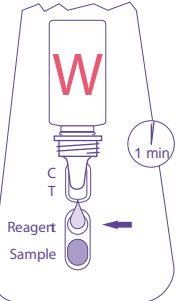
Add 1 drop Reagent W to reagent well. Wait to absorb. / Ajouter 1 goutte de Réactif W au puits du réactif. Laisser absorber. / 1 Tropfen Reagenz W in die Reagenzvertiefung geben. Absorbieren lassen. / Dispensare 1 goccia di Reagente W nel pozzetto per reagente. Lasciar assorbire. / Añadir a 1 gota de Reactivo W al pocillo de reactivo. Espere que se absorba.

5



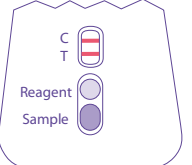
Add 1 drop Reagent 3 to reagent well. Wait 3 min. / Ajouter 1 goutte de Réactif 3 au puits du réactif. Attendre 3 min. / 1 Tropfen Reagenz 3 in die Reagenzvertiefung geben. 3 min warten. / Dispensare 1 goccia di Reagente 3 nel pozzetto per reagente. Aspettare 3 min. / Añadir 1 gota de Reactivo 3 al pocillo de reactivo. Espere 3 min.

6

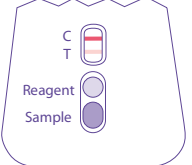


Add 1 drop Reagent W to reagent well. Wait 1 min to absorb. Read 1-10 min. / Ajouter 1 goutte de Réactif de lavage au puits du réactif. Laisser absorber pendant 1 min. Lire 1-10 min. / 1 Tropfen Waschreagenz in die Reagenzvertiefung geben. 1 min absorbieren lassen. Nach 1-10 min Ablesen. / Dispensare 1 goccia di Reagente di lavaggio nel pozzetto per reagente. Lasciar assorbire per 1 min. Leggere i risultati dopo 1-10 min. / Añadir 1 gota de Reactivo de lavado al pocillo de Reactivo. Espere 1 min a que se absorba. Lea a los 1-10 min.

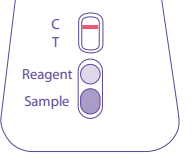
RESULTS / Résultat / Ergebnis / Risultato / Resultado



+ Result / Résultat + /
+ Ergebnis / + Risultato /
Resultado +



+ Result, weak result /
Résultat +, résultat faible /
+ Ergebnis, Schwach Ergebnis /
+ Risultato, risultato debole /
Resultado +, resultado débil



- Result /
Résultat - /
- Ergebnis /
- Risultato /
Resultado -

Positive Test: A pink line of any intensity in the Assay Window (area "T"). / Test positif : Ligne rose de n'importe quelle intensité dans la Fenêtre du dispositif (zone "T"). / Positiver Test: Eine rosafarbene Linie jeglicher Farbintensität im Testfenster (Bereich "T"). / Test positivo: una riga rosa di qualsiasi intensità nella finestra di analisi (area "T"). / Prueba positiva: Aparece una línea rosa de cualquier intensidad en la ventana del análisis (area "T").

Negative Test: No visible test line in the Assay Window (area "T"). / Test négatif : Aucune ligne de contrôle visible dans la Fenêtre du dispositif (zone "T"). / Negativer Test: Keine sichtbare Linie im Testfenster (Bereich "T"). / Test negativo: nessuna riga visibile nella finestra di analisi (area "T"). / Prueba negativa: No aparece ninguna línea de test visible en la ventana del análisis (area "T").

A Pink Control line of any intensity should appear in the Assay Window for both Positive and Negative test. / Une ligne rose de contrôle de n'importe quelle intensité doit apparaître dans la fenêtre du dispositif pour le test positif et négatif. / Sowohl bei positiven als auch bei negativen Tests sollte im Testfenster eine rosafarbene Kontroll-Linie jeglicher Farbintensität erscheinen. / Una riga di controllo rosa di qualsiasi intensità dovrebbe apparire nella finestra di analisi sia per il test positivo che per quello negativo. / Una línea rosa de control de cualquier intensidad debe aparecer en la ventana del análisis para ambos análisis, positivo y negativo.



 Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA
800-638-8663

 BENEX Limited
Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
Shannon, County Clare, Ireland
Tel: 353-61-47-29-20
Fax: 353-61-47-25-46

SQ-EASY is a trademark of Porex Technologies.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo and ColorPAC are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2006 BD.