

### Revisions

Rev from	Rev to	ECO #
0503	0604	2912-04

**Notes:**

1. BD Cat. Number 254004
2. Blank (Sheet) Size : Length: 8 1/2"    Width: 11"  
 Number of Pages: 44    Number of Sheets: 11  
 Page Size: Length 8 1/2"    Width 5 1/2"                      Final Folded Size: 8 1/2" x 5 1/2"
3. Style (see illustrations below): # 5



4. See Specification Control Number M765441JAA for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides     Yes     No  
 No. of Colors: 1                      PMS# 327 Teal
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			
Checked By	Date			
Part Number: M765441JAA		Category and Description Package Insert, Culturette Toxin CD	Sheet: 1 of 45 <hr/> Scale:    N/A	A


**BD Culturette™ Toxin CD**

**English:** pages 1 - 8  
**Français :** pages 9 - 16  
**Deutsch:** Seiten 17 - 24  
**Italiano:** pagine 25 - 32  
**Español:** páginas 33 - 40

CLIA COMPLEXITY: HIGH  
 CDC IDENTIFIER CODES  
 ANALYTE: 1022  
 TEST SYSTEM: 07486, 07487



M765441JAA  
 2004/06

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 bijsluiting. / Vaadake sūmbolite seletust infolehe lõpus. / Katso pakkausselosteen 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. informacino lapelio pabaigoje pateikiama 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 poskytné místní zástupce společnosti 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 képviselőjétől. / 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

The **Culturette™** Toxin CD test is a rapid 70-min enzyme immunoassay (EIA) for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (enterotoxin) in human stool. This assay is intended 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 and significant mortality. Although *C. difficile* may be a 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.<sup>1</sup> At the present time, the literature states that both toxin A and toxin B are produced at the same time.<sup>2</sup> 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 biologic activity in naturally-occurring disease.<sup>3</sup>

The most common clinical diagnostic aids for *C. difficile* antibiotic-associated colitis have been cell culture cytotoxicity (CTA) and latex agglutination (LA) assays.<sup>4</sup> The CTA assay detects toxin B through the cytopathic effect on cell culture. While very sensitive, this assay requires a minimum of 2 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 defining an etiologic role for *C. difficile* in patients with diarrhea.<sup>5</sup> Neither of these assays detect toxin A, the putative cause of disease.

#### PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The **Culturette** Toxin CD test utilizes an anti-toxin A capture antibody coated on microwells. The patient sample and an enzyme-conjugated anti-toxin A detector antibody are added to the microwells and incubated at 35 to 37°C for 1 h. If toxin A is present, a reactive anti-toxin enzyme complex develops. After washing to remove unbound conjugate, a substrate and a chromogen are added and incubated at room temperature for 10 min. Color develops in the presence of bound enzyme. The reactions are then read visually, or spectrophotometrically if desired.

#### REAGENTS

**Culturette** Toxin CD Kit:

<b>Reagent 1</b>	(20.0 mL)	Sample Buffer, protein stabilizer, with 0.02% thimerosal (preservative).
<b>Reagent 2</b>	(10.0 mL)	Conjugate Reagent, polyclonal (rabbit) antibody specific for <i>C. difficile</i> toxin A conjugated to horseradish peroxidase in a buffered protein stabilizer, with 0.01% thimerosal (preservative).
<b>Reagent 3</b>	(225.0 mL)	Wash Reagent, nonreactive detergent in deionized water.
<b>Reagent 4</b>	(10.0 mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Reagent, buffered solution containing hydrogen peroxide.
<b>Reagent 5</b>	(10.0 mL)	TMB Reagent, solution containing tetramethylbenzidine.
<b>Reagent 6</b>	(10.0 mL)	Stop Reagent, 1.0 N sulfuric acid. <i>Caution:</i> Avoid skin contact; if contact occurs, wash immediately with water.
<b>Control -</b>	(1.9 mL)	Negative Control, contains protein stabilizers and 0.02% thimerosal (preservative).
<b>Control +</b>	(1.9 mL)	Low Positive Control, contains inactivated <i>C. difficile</i> toxin A, protein stabilizers, and 0.01% thimerosal (preservative).
<b>Control ++</b>	(1.9 mL)	High Positive Control, contains inactivated <i>C. difficile</i> toxin A, protein stabilizers, and 0.01% thimerosal (preservative).

Microwell strips coated with polyclonal rabbit antibodies specific for *C. difficile* toxin A.

**Precautions:** For *in vitro* Diagnostic Use.

After review by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), and the Food and Drug Administration (FDA) under CLIA '88, this product has been identified as high complexity. The CDC Analyte Identifier Code is 1022; the CDC Test System Identifier Code is 07486 (visual) and 07487 (spectrophotometric).

**Reagents:** Do not use beyond the expiration date. Upon removal from the refrigerator, allow reagents to warm to room temperature before use. Do NOT mix reagents from different kit lot numbers.

Avoid prolonged exposure of **Reagents 4 and 5** to strong light.

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

Avoid skin contact with **Reagent 6** (1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Flush with water immediately if contact occurs.

**Controls:** Do not use the kit if positive and negative controls do not yield appropriate results. Positive controls are made with inactivated toxin A antigen; however, they should be handled as potentially biohazardous material.

**Transfer Pipets:** Single use; do not reuse.

**Storage of Reagents:** Upon receipt, refrigerate reagents at 2 to 8°C. DO NOT FREEZE. Reagents should be recapped and returned to refrigeration when not in use, taking care not to mix color-coded caps.

**Reagent 3 (Wash)** may be stored at room temperature (with original cap) or refrigerated at 2 to 8°C. **Allow 90 min to warm to room temperature following refrigeration.**

**Microwells:** Do not reuse. Perform microwell washing exactly as described under "Performance of Test." Inadequate washing may result in elevated background reading or random color development in toxin A negative samples.

The microwells are contained in a resealable foil envelope designed to protect strips from moisture. The envelope should be opened as described under "Assay Procedure." Keep microwells in the resealable foil envelope until the envelope reaches room temperature. Immediately replace all unused microwells into the resealable foil envelope containing the desiccant, reseal and return to refrigeration.

#### 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 48 h at 2 to 8°C is permissible. If specimens are to be tested after 48 h, specimens should be frozen at -70°C immediately upon receipt in the laboratory. Although the majority of positive specimens will show little or no reduction in toxin A detected after one freeze-thaw cycle,<sup>6</sup> *fresh specimens are preferred.*

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

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

In keeping with good laboratory practice, wear disposable gloves throughout the assay and wash hands thoroughly afterwards.

Dispose of all materials used in performing the test by autoclaving 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.* **WARNING:** Liquid waste containing sulfuric acid must be neutralized (e.g., with 1 N sodium bicarbonate) before addition of sodium hypochlorite.

Decontamination of the reusable microwell strip holder between assays can be accomplished by treatment with 0.05% sodium hypochlorite solution as described above.

#### PROCEDURE

**Materials Provided:** All materials as listed under "Reagents," Work Station, plastic Transfer Pipets, microwell Strip Holder, strip sealer, Sample Identification Template and accessories.

**Materials Required But Not Provided:** A 35 to 37°C incubator, plastic or glass test tubes (12 x 75 mm) for sample dilution, vortex mixer, EIA microwell reader capable of reading absorbance at 450 nm or 450/630 nm (optional). Also required are the necessary equipment and labware used for preparation, storage and handling of clinical specimens.

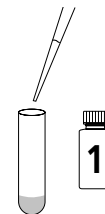
**Performance of Test:** Review "Precautions" and "Specimen Collection and Handling" prior to performing procedures. The testing area, reagents, test specimens and test components should be at room temperature when used.

Assure reagents are in the proper designated wells of the work station. Remove the bottle cap from **Reagent 3 (Wash)**, and replace with the squirt nozzle assembly provided in the kit. After the completion of daily tests, the squirt nozzle assembly on the Wash bottle should be replaced with the original bottle cap.

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

#### SPECIMEN PREPARATION:

1. Add 200 µL of **Reagent 1** (Sample Buffer) to a clean 12 x 75 mm tube using a calibrated micropipettor or a transfer pipet (up to the second mark from the tip of the pipet).

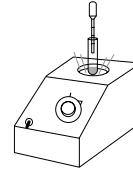


2. Mix stool sample as thoroughly as possible.

- a. *Liquid, loose or semi-solid stool*: Using a transfer pipet, transfer 100  $\mu$ L (up to the first mark) of sample into the tube containing **Reagent 1**. Using the same transfer pipet, mix by withdrawing and expelling the tube contents 2 – 3 times.



While keeping the transfer pipet in the tube, vortex the tube at moderate speed for 15 sec.



- b. *Solid stool*: Using a wood spatula, transfer approximately 200 mg (5 – 6 mm diameter, "pea" size) of stool specimen into the tube containing **Reagent 1**. Emulsify the sample and discard the wood spatula into a biohazard receptacle.

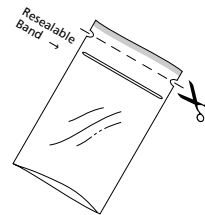


Vortex tube at moderate speed for 15 sec and place a transfer pipet into the tube.

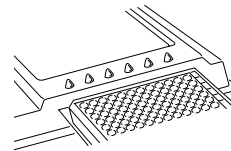
**Note:** Stool samples, once diluted in **Reagent 1**, should be assayed as soon as possible.

**Preparation of Microwells:**

1. Open the foil envelope containing the microwells by tearing or cutting at the notches between the heat seal area and the resealable band and remove the contents.



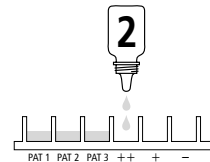
2. Remove all of the microwell strips from the holder using the row of buttons at the front of the workstation.



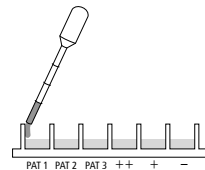
3. Break off the necessary number of microwells (one per patient, plus three controls per batch) and position them in the strip holder.
4. Return all unused microwells to the foil envelope, **reseal**, and immediately return to refrigeration.
5. Identify the location of each well using the workstation Sample Identification Template.

**ASSAY PROCEDURE:**

1. Add 2 free-falling drops of **Reagent 2** (Conjugate) to all microwells.

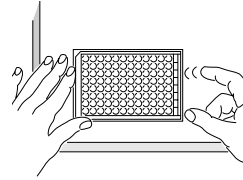


2. Using the transfer pipet or a calibrated micropipettor, draw up 100  $\mu$ L of diluted stool (up to the first mark) and allow sample to run slowly down the side of the designated microwell. Discard the transfer pipet or micropipettor tip into a biohazard receptacle.

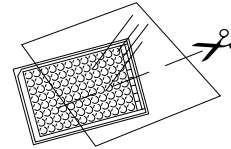


3. Using a separate transfer pipet or micropipettor tip for each control, draw up 100  $\mu$ L of **Control ++**, **Control +** and **Control -** and allow control to run slowly down the side of the designated microwells.

4. Mix the microwells by gently tapping the plate on a firm surface for 10 sec.

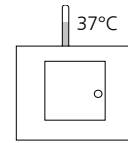


5. Trim the microwell strip sealer to size and press firmly atop the microwells.



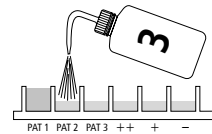
6. Incubate the plate in a 35 to 37°C incubator for 60 min.

**Note:** Ensure that proper incubator temperature is maintained throughout the 1 h incubation period.

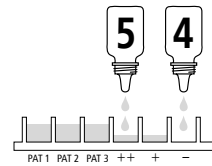


7. Gently remove the microwell strip sealer and wash the microwells with **Reagent 3** (Wash) as follows:

- DECANT by inverting (or aspirate) microwells into a biohazard receptacle.
- FIRMLY SLAP** the inverted plate on clean paper towels placed on a solid surface.
- FILL each microwell with **Reagent 3** (Wash), decant (or aspirate), and firmly slap the inverted plate on clean paper towels.
- REPEAT step "c" 4 additional times.
- After the final wash, vigorously slap the inverted plates on clean paper towels with sufficient force to remove as much excess **Reagent 3** as possible *without dislodging the strips*. Do not allow microwells to completely dry at any time.



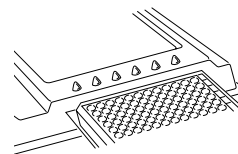
- Clean the underbottom of all microwells with a lint-free tissue.
- Add 2 free-falling drops of **Reagent 4** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) to each microwell, followed by 2 free-falling drops of **Reagent 5** (TMB).
- Mix the microwells by gently tapping the plate for 10 sec and incubate at room temperature for 10 min.



**READING RESULTS:**

- If visual determinations are to be performed, read blue color within 5 min (after the 10 min incubation period in step 10). If yellow color is preferred for visual reading, add two drops **Reagent 6** (Stop) to each microwell immediately after the 10 min incubation period in step 10, gently tap for 10 sec and read yellow color within 10 min after adding **Reagent 6**.
- If EIA microwell reader determinations are to be performed, clean the underbottom of all microwells, zero the EIA reader on air (without microwells), and read absorbance at 450 nm or 450/630 nm within 10 min after adding **Reagent 6**.

3. After completion of tests, used microwell strips may be removed from the strip holder by pressing the holder against the row of buttons at the front of the workstation. Used microwells should be disposed of as described under "Specimen Collection and Handling."



**Quality Control:** The **Control +** (Low Positive) and **Control -** should be included with each batch of specimens to verify performance of the reagents and proper procedural technique. A **Control ++** (High Positive) is also provided as an optional means of verifying two levels of positive reactions. This is of particular value when results are read visually as an added assurance of procedural integrity.

Patient results should not be reported if positive and negative controls do not yield appropriate results as described in the table opposite.

	VISUAL	450 nm	450/630 nm
Control ++	Strong Color (Blue or Yellow)	>1.500	>1.455
Control +	Moderate Color (Blue or Yellow)	0.300 – 1.000	0.250 – 0.900
Control -	Colorless	<0.100	<0.070

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 NCCLS guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

#### INTERPRETATION OF RESULTS

The **Culturette** Toxin CD test is designed to enable visual reading of a blue color after step 10 ("Assay Procedure") or alternatively, a yellow color following the addition of **Reagent 6**. The test can also be read by an EIA Microwell Reader.

- Blue Visual Reading:**  
Negative = Colorless  
Positive = Blue color of **any** intensity
- Yellow Visual Reading (Reagent 6 addition):**  
Negative = Colorless  
Positive = Yellow color of **any** intensity
- EIA Microwell Reader, Single Wavelength (450 nm):**  
Negative =  $OD_{450} < 0.1$   
Indeterminate =  $OD_{450} \geq 0.1$  but  $< 0.15$   
Positive =  $OD_{450} \geq 0.15$
- EIA Microwell Reader, Dual Wavelength (450/630 nm):**  
Negative =  $OD_{450/630} < 0.070$   
Indeterminate =  $OD_{450/630} \geq 0.070$  but  $< 0.100$   
Positive =  $OD_{450/630} \geq 0.100$

When using an EIA microwell reader to interpret reactions, indeterminate results should be repeated. If the results are still indeterminate, a fresh patient specimen should be obtained and tested. When reading visually, reactions should be recorded as positive if color of any intensity develops. Colorless reactions are recorded as negative.

**Note:** Extremely strong positive reactions may produce a dark brown precipitate within 5 – 10 min after the addition of **Reagent 6**, which does not interfere with interpretation of results.

#### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The **Culturette** Toxin CD test detects the presence of toxin A in human stool. Since the level of toxin A has not been shown to have a definitive correlation with the presence or severity of disease, the assay results should be interpreted by a physician in conjunction with clinical and other laboratory findings.

Some isolates of *Clostridium sordellii* have been shown to produce a hemorrhagic toxin (HT) which has similar biologic, physicochemical and immunochemical properties as toxin A. The HT may cross react in tests for toxin A.<sup>4</sup> 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.<sup>11,12</sup>

As with other brands of tests, specimen handling is important for the maintenance of toxin A titers. If testing is delayed, 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. Up to 1% of healthy adults may have positive stool toxin tests on culture.<sup>13</sup> The rate of nosocomial infections may vary with the institution, section, housekeeping practices and patient population.<sup>13,14</sup> The **Culturette** Toxin CD test has given positive rates of 3.8% to 18.5% in symptomatic patients.<sup>15</sup> Positive rates above or below these values may be found.

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance of the **Culturette** Toxin CD test was determined in prospective evaluations conducted at four major independent medical centers located in geographically distinct areas of the United States. A total of 905 fresh stool specimens from symptomatic patients with suspected *C. difficile*-associated disease that were specifically submitted for *C. difficile* cytotoxin B testing were utilized in this evaluation. The mean prevalence of *C. difficile* in patient samples tested was 13%, ranging from 4% to 20%. Cytotoxin B test results were used as the primary reference method. Discordant specimens were retested in duplicate, and if still unresolved, the **Culturette** Toxin CD test result was compared to a consensus result. The consensus result was determined by reviewing the clinical diagnosis, toxigenic culture result and other testing information when available. Results of the study are presented in Table 1 where the **Culturette** Toxin CD test is interpreted by an EIA microwell reader and in Tables 2 and 3 where interpreted by blue and yellow visual color, respectively. The **Culturette** Toxin CD test delivered performance levels of 87 – 92% sensitivity and 95 – 98% specificity depending on the reading method and reference utilized. Indeterminate results are not included in the calculations for sensitivity and specificity.

**Table 1**  
**Comparison of Culturette Toxin CD Test Results Using an EIA Microwell Reader Versus Cytotoxin Test Results and Cytotoxin Results Plus Resolution of Discordants**

Culturette Toxin CD	Cytotoxin Result		Cytotoxin Plus Resolution of Discordants	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	99	24	110	12
Negative	17	732	9	760
Indeterminate	5	19	2	3

\*Sensitivity 85% **92%**  
 \*Specificity 97% **98%**  
 Positive Predictive Value 80% **89%**  
 Negative Predictive Value 98% **99%**  
 Indeterminate 3% **<1%**  
 Overall Accuracy 93% **97%**  
 \*\*Total Number 896 **896**

**Table 2**  
**Comparison of Culturette Toxin CD Test Results Using a Visual Blue Color Endpoint Versus Cytotoxin Test Results**

Culturette Toxin CD	Cytotoxin Result	
	Positive	Negative
Positive	103	21
Negative	15	727

\*Sensitivity 87%  
 \*Specificity 97%  
 Positive Predictive Value 83%  
 Negative Predictive Value 98%  
 Overall Accuracy 95%  
 \*\*\*Total Number 871

**Table 3**  
**Comparison of Culturette Toxin CD Test Results Using a Visual Yellow Color Endpoint Versus Cytotoxin Test Results**

Culturette Toxin CD	Cytotoxin Result	
	Positive	Negative
Positive	104	37
Negative	14	710

\*Sensitivity 88%  
 \*Specificity 95%  
 Positive Predictive Value 74%  
 Negative Predictive Value 98%  
 Overall Accuracy 93%  
 \*\*\*Total Number 871

\*Weighted averages based on the number of positive or negative specimens tested at each trial site in relation to the number of specimens tested.

\*\*Spectrophotometric readings were not recorded for 9 specimens.

\*\*\*Visual endpoint results were not recorded for 34 specimens.

The reproducibility of the assay was tested using three control samples containing high, low and zero amounts of toxin A. The concordance of single and dual wavelength readings for positive and negative was 100%. The intra- and inter-assay precision in liquid stool samples is presented in Table 4.

**Table 4: Culturette Toxin CD Assay Precision**

Sample	Mean Single	Mean Dual	%CV Intraassay Single	%CV Interassay Single	%CV Intraassay Dual	%CV Interassay Dual
Control -	0.0440	0.0075	4.34	4.77	10.6	18.67
Control +	0.6692	0.6285	7.6	10.55	8.06	11.06
Control ++	2.38	2.32	9.23	13.92	9.18	13.95

A breakdown of the stool specimen consistency encountered from the symptomatic patients in this study is presented in Table 5. The information is presented from a total specimen perspective and for positive specimens only.

**Table 5: Stool Specimen Consistency**

	Total Population N/%	Positive Specimens N/%
Liquid	100 (11%)	6 (5%)
Loose	371 (41%)	67 (55%)
Semi-Solid	263 (29%)	35 (29%)
Solid	150 (17%)	11 (9%)
Not Classified	21 (2%)	3 (2%)

**Table 6**

Microorganism	Absorbance at 450 nm	
	In Negative Stool	In Positive Stool
<i>Aeromonas hydrophilia</i> ATCC™ 7966	0.054 (-)	0.980 (+)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0.053 (-)	0.951 (+)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 33608	0.062 (-)	0.993 (+)
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	0.054 (-)	0.902 (+)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0.053 (-)	0.920 (+)
<i>Clostridium botulinum</i> ATCC 17786	0.056 (-)	0.966 (+)
<i>Clostridium butyricum</i> ATCC 8260	0.057 (-)	0.904 (+)
<i>Clostridium histolyticum</i> ATCC 19401	0.055 (-)	0.959 (+)
<i>Clostridium innocuum</i> ATCC 14501	0.054 (-)	0.990 (+)
<i>Clostridium novyi</i> ATCC 19402	0.054 (-)	0.832 (+)
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	0.055 (-)	0.984 (+)
<i>Clostridium septicum</i> ATCC 12464	0.055 (-)	1.006 (+)
<i>Clostridium sordellii</i> VPI 9048	0.280 (+)	1.124 (+)
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 3584	0.057 (-)	0.858 (+)
<i>Clostridium subterminale</i> ATCC 29748	0.058 (-)	0.891 (+)
<i>Clostridium tetani</i> ATCC 19406	0.057 (-)	0.839 (+)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0.053 (-)	0.903 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	0.058 (-)	0.884 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43889	0.057 (-)	0.297 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43894	0.056 (-)	0.312 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43895	0.058 (-)	0.281 (+)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	0.061 (-)	0.808 (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14207	0.056 (-)	0.835 (+)
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	0.051 (-)	0.838 (+)
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 29027	0.054 (-)	0.942 (+)
<i>Shigella flexnerii</i> ATCC 12661	0.053 (-)	0.941 (+)
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	0.056 (-)	0.969 (+)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598	0.051 (-)	1.069 (+)
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 11623	0.052 (-)	0.944 (+)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0.053 (-)	0.799 (+)
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	0.056 (-)	1.016 (+)

**Cross Reactivity:** The **Culturette** Toxin CD test reacts with all known toxigenic reference strains of *C. difficile*.<sup>15</sup> The test did not react with the nontoxigenic strain of VPI 11186. Cross reactivity was demonstrated to be negative with the bacteria shown in Table 6. Testing was performed by taking *C. difficile* toxin A negative and positive stools and adding the various organisms to final concentrations of 10<sup>7</sup> to 10<sup>9</sup> CFU/mL stool. 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* toxins 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.

#### AVAILABILITY

Cat. No.	Description
254004	<b>Culturette</b> <sup>™</sup> Toxin CD, 96 test kit.
264001	<b>Culturette</b> <sup>™</sup> <b>CDT</b> <sup>™</sup> Rapid <i>C. difficile</i> latex test, 25 test kit.
273310	Pipette Tips, box of 1000.

#### REFERENCES

- Sullivan, N.M., S. Pellett 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. 1990. *Clostridium difficile*: clinical considerations. *Rev. Infect. Dis.* 12:S243-S251.
- Lyerly, D.M., H.C. Krivan and T.D. Wilkins. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin. Microbiol.* 1:1-18.
- Baron, E.J. 1989. Assessment of currently-available laboratory tests for *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin. Microbiol. Newsl.* 11:118-120.
- Lyerly, D.M., D.E. Lockwood, S.H. Richardson and T.D. Wilkins. 1982. Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 35:1147-1150.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
- 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.
- 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.
- 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.
- COOPERSTOCK, M. 1988. *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* IN INFANTS AND CHILDREN. *IN* R.O. ROLFE, AND S.M. FINEGOLD (EDS.). *CLOSTRIDIUM DIFFICILE: ITS ROLE IN INTESTINAL DISEASE*. ACADEMIC PRESS, INC., SAN DIEGO, CA., P. 45-64.
- Peach, S.L., S.P. Borriello, H. Gayla, F.E. Barclay, and A.R. Welch. 1968. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Pathol.* 39:1013-1018.
- Delmee, M., B. Vandercam, V. Avesani and J.L. Michaux. 1987. Epidemiology and prevention of *Clostridium difficile* infections in a leukemia unit. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6:623-627.
- Gerding, D.M. 1989. Disease associated with *Clostridium difficile* infection. *Ann. Intern. Med.* 110:255-257.
- Data on file at BD Diagnostics.



# BD Culturette Toxin CD

Français

COMPLEXITE CLIA : CODES  
IDENTIFICATEURS DU CDC HAUTES  
ANALYTE : 1022  
SYSTEME D'ANALYSE : 07486, 07487

**APPLICATION**

Le test **Culturette Toxin CD** est un test immunoenzymologique (EIA) rapide (70 min) pour la détection qualitative de la toxine A (entérotoxine) de *Clostridium difficile* dans les selles humaines. Ce test contribue au diagnostic des maladies associées au *C. difficile*.

**RESUME ET EXPLICATION**

*C. difficile* est une cause importante de diarrhée après la prise d'antibiotiques qui, dans sa forme la plus sévère, peut entraîner une colite pseudomembraneuse et une mortalité significative. Bien que *C. difficile* puisse être présent dans la flore bactérienne normale de l'intestin, il peut devenir un agent pathogène opportuniste suite à un traitement aux antibiotiques et à la détérioration de la flore intestinale normale qui en résulte. Dans les conditions adéquates, les souches de *C. difficile*, productrices de toxine, fabriquent deux toxines – la toxine A, une entérotoxine qui attaque les tissus, et la toxine B, une cytotoxine *in vitro*.<sup>1</sup> A l'heure actuelle, la littérature rapporte que les toxines A et B sont produites simultanément.<sup>2</sup> Les symptômes cliniques de la maladie sont considérés comme étant causés essentiellement par la toxine A, par contre, il n'existe pas actuellement de preuve convaincante d'une importante activité biologique de la toxine B dans les maladies survenant naturellement.<sup>3</sup>

Les tests les plus courants pour le diagnostic des colites dues à *C. difficile* après la prise d'antibiotiques sont le test de cytotoxicité d'une culture cellulaire (CTA) et le test d'agglutination au latex (LA).<sup>4</sup> Le test CTA détecte la toxine B par l'effet cytopathique sur la culture cellulaire. Il est très sensible, mais il demande une durée d'au moins 2 jours. L'agglutination au latex détecte les antigènes de *C. difficile* plutôt que les toxines spécifiques, mais ce test est considéré comme rapide et efficace pour la mise en évidence du rôle étiologique de *C. difficile* chez les patients atteints de diarrhée.<sup>5</sup> Aucun de ces tests ne détecte la toxine A, supposée être la cause de la maladie.

**PRINCIPES DE LA MÉTHODE**

Le test **Culturette Toxin CD** utilise un anticorps de capture de l'antitoxine A fixé sur les micropuits. L'échantillon du patient et un anticorps conjugué à l'enzyme, détecteur de l'antitoxine A, sont ajoutés aux micropuits et incubés pendant 1 heure entre 35 et 37 °C. Si la toxine A est présente, il se développe un complexe réactif enzyme/antitoxine. Après lavage permettant d'éliminer le conjugué non fixé, on ajoute un substrat et un chromogène qui sont incubés 10 min à température ambiante. La coloration se développe en présence de l'enzyme lié. Les réactions sont lues à l'œil nu ou si on veut, par spectrophotométrie.

**REACTIFS**

Trousse **Culturette Toxin CD** :

<b>Réactif 1</b>	(20,0 mL)	Tampon pour échantillon, stabilisateur de protéine, contenant 0,02 % de thimérol (conservateur).
<b>Réactif 2</b>	(10,0 mL)	Réactif conjugué, anticorps polyclonal (lapin) spécifique de la toxine A de <i>C. difficile</i> , conjugué à la peroxydase de raifort dans un stabilisateur de protéine tamponné, contenant 0,01 % de thimérol (conservateur).
<b>Réactif 3</b>	(225,0 mL)	Réactif de lavage, détergent non réactif dans l'eau désionisée.
<b>Réactif 4</b>	(10,0 mL)	Réactif H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , solution tamponnée contenant du peroxyde d'hydrogène.
<b>Réactif 5</b>	(10,0 mL)	Réactif TMB, solution contenant du tétraméthylbenzidine.
<b>Réactif 6</b>	(10,0 mL)	Solution d'arrêt, acide sulfurique 1,0 N. <i>Attention</i> : éviter le contact cutané ; en cas de contact, rincer immédiatement à l'eau.
<b>Contrôle -</b>	(1,9 mL)	Contrôle négatif, contient des stabilisateurs de protéine et 0,02 % de thimérol (conservateur).
<b>Contrôle +</b>	(1,9 mL)	Contrôle faiblement positif, contient de la toxine A inactivée de <i>C. difficile</i> , des stabilisateurs de protéine et 0,01 % de thimérol (conservateur).
<b>Contrôle ++</b>	(1,9 mL)	Contrôle fortement positif, contient de la toxine A inactivée de <i>C. difficile</i> , des stabilisateurs de protéine et 0,01 % de thimérol (conservateur).

Bandelettes de micropuits recouvertes d'anticorps polyclonaux de lapin spécifiques de la toxine A de *C. difficile*.

**Précautions** : réservé au diagnostic *in vitro*.

Après une évaluation par le U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) et la U.S. Food and Drug Administration (FDA) selon CLIA '88, ce produit a été identifié comme d'haute complexité. Le code identificateur "Analyte" du CDC (Analyte Identifier Code) est 1022 ; le code identificateur du système d'analyse du CDC (Test System Identifier Code) est 07486 (visuel) et 07487 (spectrophotométrique).

**Réactifs** : utiliser avant la date de péremption. Après avoir sorti les réactifs du réfrigérateur, les laisser se réchauffer à température ambiante avant de les utiliser. NE PAS MELANGER des réactifs provenant de trousse portant des numéros de lot différents.

Eviter une exposition prolongée des **Réactifs 4 et 5** à une lumière intense.

Pour assurer la distribution d'une taille correcte de gouttes, maintenir le flacon distributeur verticalement au-dessus des micropuits de manière à ne distribuer qu'une seule goutte à écoulement libre à la fois.

Eviter le contact cutané avec le **Réactif 6** (1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Rincer immédiatement à l'eau en cas de contact.

**Contrôles** : ne pas utiliser la trousse si les contrôles positif et négatif ne donnent pas les résultats appropriés. Les contrôles positifs sont préparés à partir d'antigène de toxine A inactivée, mais, ils doivent cependant être traités comme des substances potentiellement toxiques.

**Pipettes de transfert** : à usage unique, à ne pas réutiliser.

**Conservation des réactifs** : dès réception, réfrigérer les réactifs entre 2 et 8 °C. NE PAS CONGELER. Les réactifs devront être rebouchés et remis au réfrigérateur lorsqu'ils ne sont pas utilisés, en prenant soin de ne pas intervertir le bouchon dont la couleur est codée.

Le **Réactif 3** (lavage) peut être conservé à température ambiante avec son bouchon d'origine ou réfrigéré entre 2 et 8 °C. **Après réfrigération, permettre une période de 90 min afin de les laisser se réchauffer à température ambiante.**

**Micropuits** : à ne pas réutiliser. Exécuter le lavage du micropuits exactement selon les instructions de la rubrique "Exécution du test". Un lavage non approprié peut entraîner une augmentation de la lecture de fond, ou un changement de coloration aléatoire dans les échantillons négatifs de toxine A.

Les micropuits sont présentés en enveloppe d'aluminium refermable destinée à protéger les bandelettes de l'humidité. Les enveloppes doivent être ouvertes selon le processus décrit à la rubrique "Mode opératoire". Laisser les micropuits dans leur enveloppe refermable jusqu'à réchauffement à la température ambiante. Remettre immédiatement tous les micropuits non utilisés dans l'enveloppe contenant l'agent de dessiccation, refermer et remettre au réfrigérateur.

#### PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Prélever les échantillons de selles dans un récipient propre et hermétique sans conservateur. Les échantillons doivent être testés dès réception au laboratoire ; il est cependant possible de les conserver jusqu'à 48 h entre 2 et 8 °C. Si les échantillons doivent être testés après plus de 48 h, il faut les congeler à -70 °C dès réception au laboratoire. Bien que la majorité des échantillons positifs ne présenteraient pas ou peu de réduction en toxine A après un cycle de congélation-décongélation,<sup>9</sup> *il est préférable d'utiliser des échantillons frais.*

Laisser les échantillons atteindre la température ambiante et les mélanger aussi soigneusement que possible avant de les employer.

**AVERTISSEMENT** : des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les "Précautions standard"<sup>7-10</sup> et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques.

Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire, porter des gants jetables pendant tout le test et se laver soigneusement les mains ensuite.

Traiter tout le matériel utilisé pour exécuter le test par autoclavage à 121 °C pendant 60 min ou à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 0,05 % (dilution d'eau de Javel au 1:100) pendant 30 min. *Ne pas autoclaver du matériel contenant de l'hypochlorite de sodium.* **AVERTISSEMENT** : des déchets liquides contenant de l'acide sulfurique doivent être neutralisés (par exemple avec du bicarbonate de sodium 1 N) avant l'addition d'hypochlorite de sodium.

La décontamination du support des bandelettes de micropuits réutilisable entre les tests peut être réalisée en le traitant à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 0,05 % (voir description ci-dessus).

#### MODE OPERATOIRE

**Matériel fourni** : tout ce qui figure à la rubrique "Réactifs", le poste de travail, les pipettes de transfert en plastique, le support des bandelettes de micropuits, bande de fermeture, la matrice d'identification des échantillons et les accessoires.

**Matériaux requis, mais non fournis** : un incubateur (35 à 37 °C), des tubes à essai en plastique ou en verre (12 x 75 mm) pour la dilution des échantillons, un agitateur Vortex, un lecteur de micropuits EIA mesurant l'absorbance à 450 nm ou 450/630 nm (en option).

L'équipement et le matériel de laboratoire utilisés pour la préparation, la conservation et la manipulation des échantillons cliniques sont également nécessaires.

**Exécution du test** : relire les rubriques "Précautions" et "Prélèvement et préparation des échantillons" avant de procéder au test. Lors de l'analyse, le plan de travail, les réactifs, les échantillons et les composants du test doivent tous être à température ambiante.

S'assurer que les réactifs sont bien dans les emplacements du poste de travail, prévus à cet effet. Oter le bouchon du flacon de **Réactif 3** (lavage) et remplacer par le gicleur fourni dans la trousse. A la fin des tests quotidiens, remplacer le gicleur monté sur le flacon de lavage par le bouchon d'origine.

Mélanger doucement en retournant les réactifs avant usage. Eviter la formation de mousse.

**Préparation des échantillons :**

1. Ajouter 200  $\mu\text{L}$  de **Réactif 1** (tampon pour échantillon) dans un tube 12 x 75 mm propre à l'aide d'une micropipette calibrée ou d'une pipette de transfert (jusqu'au second repère en partant de la pointe de la pipette).

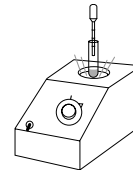


2. Mélanger l'échantillon de selle aussi soigneusement que possible.

- a. *Selle liquide, molle ou semi-solide* : à l'aide d'une pipette de transfert, transférer 100  $\mu\text{L}$  (jusqu'au 1er repère) d'échantillon dans le tube contenant le **Réactif 1**. A l'aide de la même pipette de transfert, mélanger en aspirant et refoulant 2 à 3 fois le contenu du tube.



Laisser la pipette de transfert dans le tube et mélanger le tube sur Vortex à vitesse modérée pendant 15 s.



- b. *Selle solide* : à l'aide d'une spatule en bois transférer environ 200 mg (diamètre de 5 à 6 mm, la taille d'un "pois") de l'échantillon de selle dans le tube contenant le **Réactif 1**. Emulsifier l'échantillon et jeter la spatule en bois dans un récipient pour déchets toxiques.

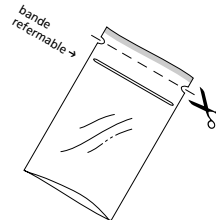
Mélanger le tube sur un Vortex à vitesse modérée pendant 15 s et y placer une pipette de transfert.



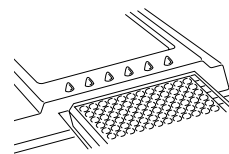
**Remarque** : lorsque les échantillons de selles sont dilués dans le **Réactif 1**, le test doit être exécuté dès que possible.

**Préparation des micropuits :**

1. Ouvrir l'enveloppe d'aluminium contenant les micropuits en déchirant ou en coupant au niveau des encoches situées entre la zone thermoscellée et la bande refermable et sortir le contenu.



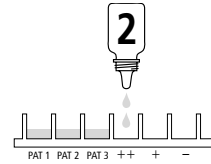
2. Retirer toutes les bandelettes de micropuits du support à l'aide de la rangée de boutons à l'avant du poste de travail.



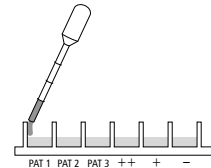
3. Détacher le nombre nécessaire de micropuits (un par patient, plus trois contrôles par lot) et les placer dans le support de bandes.
4. Remettre les puits non utilisés dans l'enveloppe d'aluminium, **refermer** et remettre immédiatement au réfrigérateur.
5. Identifier la localisation de chaque puits à l'aide de la matrice d'identification d'échantillon du poste de travail.

**Méthodes de dosages :**

1. Ajouter 2 gouttes à écoulement libre de **Réactif 2** (conjugué) à tous les micropuits.

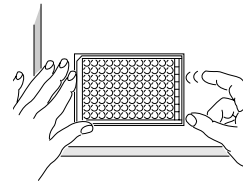


2. A l'aide de la pipette de transfert ou d'une micropipette graduée, aspirer 100 µL de selle diluée (jusqu'au 1er repère) et laisser l'échantillon couler lentement le long de la paroi du micropuits. Jeter la pipette de transfert ou l'embout de micropipette dans un récipient pour déchets toxiques.

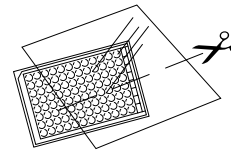


3. A l'aide d'une pipette de transfert ou d'un embout de micropipette différent pour chaque contrôle, aspirer 100 µL de **Contrôle ++**, **Contrôle +** et **Contrôle -** et laisser le contrôle couler lentement le long de la paroi du micropuits.

4. Mélanger les micropuits en tapotant doucement 10 s la plaque sur une surface dure.

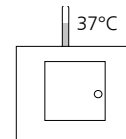


5. Couper la bande de fermeture des micropuits à la taille nécessaire et fermer les micropuits en appuyant fortement.



6. Incuber la plaque 60 min dans un incubateur entre 35 et 37 °C.

**Note :** Maintenir la température appropriée dans l'incubateur pendant toute la période d'incubation (1 h).



7. Oter avec précaution la bande de fermeture et laver les micropuits à l'aide du **Réactif 3** (lavage) comme suit :

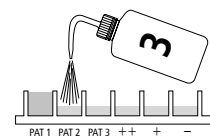
a. DECANTER en retournant (ou aspirant) les micropuits dans un récipient pour déchets toxiques.

b. FRAPPER VIGOREUSEMENT la plaque retournée sur des serviettes en papier propres placées sur une surface dure.

c. REMPLIR chaque micropuits de **Réactif 3** (lavage), décanter (ou aspirer) et frapper vigoureusement la plaque retournée placée sur des serviettes de papier propres.

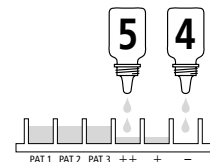
d. REPETER l'étape "c" 4 fois.

e. Après le lavage final, frapper la plaque retournée placée sur des serviettes de papier propres suffisamment vigoureusement pour ôter autant d'excédent de **Réactif 3** que possible *sans faire tomber les bandes*. Ne jamais laisser les micropuits s'assécher complètement.



8. Nettoyer le fonds des micropuits à l'aide d'un tissu qui ne peluche pas.

9. Ajouter à chaque micropuits 2 gouttes à écoulement libre de **Réactif 4** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), puis 2 gouttes à écoulement libre de **Réactif 5** (TMB).

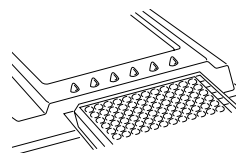


10. Mélanger les micropuits en tapotant doucement la plaque 10 s et incuber 10 min à température ambiante.

**Lecture des résultats :**

1. En cas de détermination visuelle, lire la coloration bleue dans les 5 min (après 10 min d'incubation à l'étape 10). Si vous préférez la coloration jaune pour la détermination visuelle, ajouter 2 gouttes de **Réactif 6** (arrêt) à chaque micropuits immédiatement après l'incubation de 10 min à l'étape 10. Tapoter doucement pendant 10 s et lire la coloration jaune dans les 10 min après l'addition du **Réactif 6**.
2. Pour les déterminations par lecteur de micropuits EIA, nettoyer le fond de chaque puits, régler le zéro du lecteur sur air (sans micropuits) et mesurer l'absorbance à 450 nm ou 450/630 nm dans les 10 min suivant l'addition du **Réactif 6**.

3. A la fin des tests, les bandelettes de micropuits usagées peuvent être ôtées du support de bandes en pressant le support contre la rangée de boutons sur la face avant du poste de travail. Traiter les puits usagés comme indiqué à la rubrique "Prélèvement et traitement des échantillons".



**Contrôle de qualité :** le **Contrôle +** (faiblement positif) et le **Contrôle -** doivent être inclus dans chaque lot d'échantillons pour vérifier la performance des réactifs et le respect du mode opératoire. Un **Contrôle ++** (fortement positif) est aussi fourni comme moyen optionnel de vérifier deux niveaux de réactions positives. C'est une garantie complémentaire de la fiabilité de la méthode, en particulier lorsque les résultats sont lus à l'œil nu.

Les résultats concernant des patients ne devraient pas être rapportés si les contrôles positif et négatif ne donnent pas les résultats appropriés décrit dans le tableau ci-dessous.

	VISUEL	450 nm	450/630 nm
Contrôle ++	Forte coloration (bleue ou jaune)	>1,500	>1,455
Contrôle +	Coloration modérée (bleue ou jaune)	0,300 – 1,000	0,250 – 0,900
Contrôle -	Incolore	<0,100	<0,070

Effectuer les contrôles de qualité conformément à la réglementation nationale et/ou internationale, aux exigences des organismes normatifs concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Se reporter aux normes des NCCLS et CLIA pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

**INTERPRETATION DES RESULTATS**

Le test **Culturette** Toxin CD est conçu pour permettre la lecture visuelle d'une coloration bleue après l'étape 10 ("Mode opératoire") ou, alternativement, d'une coloration jaune après l'addition du **Réactif 6**. Le test peut aussi être lu avec un lecteur de micropuits EIA.

1. **Lecture visuelle du bleu :**  
Négatif = Incolore  
Positif = Coloration bleue, **indépendamment** de l'intensité
2. **Lecture visuelle du jaune (addition du Réactif 6) :**  
Négatif = Incolore  
Positif = Coloration jaune, **indépendamment** de l'intensité
3. **Lecteur de micropuits EIA, une seule longueur d'onde (450 nm) :**  
Négatif =  $OD_{450} < 0,1$   
Indéterminé =  $OD_{450} \geq 0,1$  mais  $< 0,15$   
Positif =  $OD_{450} \geq 0,15$
4. **Lecteur de micropuits EIA, deux longueurs d'onde (450/630 nm) :**  
Négatif =  $OD_{450/630} < 0,070$   
Indéterminé =  $OD_{450/630} \geq 0,070$  mais  $< 0,100$   
Positif =  $OD_{450/630} \geq 0,100$

Quand on utilise un lecteur de micropuits EIA pour interpréter les réactions, il faut refaire le test si les résultats sont indéterminés. Si les résultats sont toujours indéterminés, il est nécessaire de se procurer et d'analyser un échantillon frais. Au moment de la lecture visuelle, la réaction est jugée positive s'il y a coloration, peu importe l'intensité. Les réactions incolores sont jugées négatives.

**Remarque :** les réactions très fortement positives peuvent provoquer, 5 – 10 min après l'addition du **Réactif 6**, un précipité brun foncé qui n'influence pas l'interprétation des résultats.

**LIMITES DE LA METHODE**

Le test **Culturette** Toxin CD détecte la présence de la toxine A dans les selles humaines. En l'absence d'une corrélation prouvée de la quantité de toxine A avec la présence ou la gravité de la maladie, les résultats du test doivent être interprétés par un médecin en tenant compte des résultats cliniques et d'autres résultats de laboratoire.

Il a été montré que certains isolats de *Clostridium sordellii* produisent une toxine hémorragique (HT) ayant des propriétés biologiques, physicochimiques et immunochimiques similaires à celles de la toxine A. La HT peut provoquer une réaction croisée dans un test destiné à la toxine A.<sup>4</sup> Les souches de HT de *C. sordellii* n'ont pas été détectées chez des patients affectés de diarrhée et de colite, après prise d'antibiotiques. Les selles d'enfants et de patients affectés de fibrose kystique peuvent contenir la toxine de *C. difficile* sans aucune signification clinique.<sup>11,12</sup>

Comme pour les autres marques de tests, la manipulation de l'échantillon est importante pour la conservation des titres de toxine A. Si le test est retardé, il est recommandé de congeler les échantillons à -70 °C (voir "Prélèvement et préparation des échantillons").

#### VALEURS ESCOMPTEES

*Clostridium difficile* est un agent pathogène opportuniste qui exerce ses effets toxiques lorsque l'appareil gastro-intestinal a été affecté, comme lors d'une prise d'antibiotiques. Par conséquent, les patients qui ont pris des antibiotiques récemment ou ceux qui sont soumis à un traitement chronique, sont infectés le plus souvent. Jusqu'à 1 % des adultes en bonne santé peuvent présenter des résultats positifs lors de tests de détection de toxines effectués à partir de cultures de selles.<sup>13</sup> Le taux d'infections nosocomiales peut varier en fonction de l'institution, du service, des méthodes de nettoyage et de la population de patients.<sup>13,14</sup> Le test **Culturette** Toxin CD a détecté des taux positifs compris entre 3,8 % et 18,5 % chez les patients symptomatiques.<sup>15</sup> Il est possible de trouver des taux positifs supérieurs ou inférieurs à ces valeurs.

#### CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

La performance du test **Culturette** Toxin CD a été déterminée lors d'évaluations prospectives menées dans quatre grands centres médicaux indépendants situés dans différentes zones géographiques des Etats-Unis. Un total de 905 échantillons de selles fraîches de patients symptomatiques soupçonnés d'une maladie associée à *C. difficile* et ayant subi un test spécifique de recherche de la cytotoxine B de *C. difficile*, ont été utilisés dans cette évaluation. La prédominance moyenne de *C. difficile* dans les échantillons de patients testés était de 13 %, variant de 4 à 20 %. Les résultats du test de cytotoxine B ont été utilisés comme méthode de référence primaire. Les échantillons aberrants ont été retestés en double et s'ils restaient indéterminés, le test **Culturette** Toxin CD était comparé à un résultat indiscutable, obtenu en tenant compte du diagnostic clinique, du résultat de la culture toxigène et, le cas échéant, d'autres informations sur des tests. Les résultats de l'étude sont présentés dans le Tableau 1 où le test **Culturette** Toxin CD est interprété par un lecteur de micropuits EIA et dans les Tableaux 2 et 3 où il est interprété par lecture visuelle de la coloration bleue et jaune. Le test **Culturette** Toxin CD garantit les performances suivantes : une sensibilité de 87 – 92 % et une spécificité de 95 – 98 % selon la méthode de lecture et la référence employées. Les résultats "indéterminés" ne sont pas inclus dans les calculs de la sensibilité et de la spécificité.

Tableau 1

Comparaison des résultats du test **Culturette** Toxin CD obtenus par lecteur de micropuits EIA contre les résultats du test de cytotoxine et les résultats de cytotoxine plus résolution des aberrants

Culturette Toxin CD	Résultat de cytotoxine		Cytotoxine plus résolution des aberrants	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Positif	99	24	110	12
Négatif	17	732	9	760
Indéterminé	5	19	2	3

*Sensibilité	85 %	<b>92 %</b>
*Spécificité	97 %	<b>98 %</b>
Valeur de prédiction positive	80 %	<b>89 %</b>
Valeur de prédiction négative	98 %	<b>99 %</b>
Indéterminé	3 %	<b>&lt;1 %</b>
Exactitude globale	93 %	<b>97 %</b>
**Nombre total	896	<b>896</b>

Tableau 2

Comparaison des résultats du test **Culturette** Toxin CD obtenus par lecture visuelle en point final de la coloration bleue contre les résultats du test de cytotoxine

Culturette Toxin CD	Résultat de cytotoxine	
	Positif	Négatif
Positif	103	21
Négatif	15	727

*Sensibilité	87 %
*Spécificité	97 %
Valeur de prédiction positive	83 %
Valeur de prédiction négative	98 %
Exactitude globale	95 %
***Nombre total	871

**Tableau 3**  
**Comparaison des résultats du test Culturette Toxin CD obtenus par lecture visuelle en point final de la coloration jaune contre résultats du test de cytotoxine**

Culturette Toxin CD	Résultat de cytotoxine	
	Positif	Négatif
Positif	104	37
Négatif	14	710

*Sensibilité	88 %
*Spécificité	95 %
Valeur de prédiction positive	74 %
Valeur de prédiction négative	98 %
Exactitude globale	93 %
***Nombre total	871

\*Moyennes pondérées fondées sur le nombre d'échantillons positifs ou négatifs testés sur chaque site rapporté au nombre total d'échantillons testés.

\*\*Les mesures par spectrophotométrie n'ont pas été relevées pour 9 échantillons.

\*\*\*Les résultats visuels en point final n'ont pas été relevés pour 34 échantillons.

La reproductibilité du test a été testée à l'aide de trois contrôles contenant des quantités importantes, faibles et nulles de toxine A. La concordance des lectures des contrôles positifs et négatifs par une seule ou deux longueurs d'onde était de 100 %. La précision à l'intérieur du test et entre les tests dans les échantillons de selles liquides est présentée dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 4 : Précision du test Culturette Toxin CD**

Echantillon	Moyenne simple	Moyenne double	% CV Intratest simple	% CV Intertest simple	% CV Intratest double	% CV Intertest double
Contrôle -	0,0440	0,0075	4,34	4,77	10,6	18,67
Contrôle +	0,6692	0,6285	7,6	10,55	8,06	11,06
Contrôle ++	2,38	2,32	9,23	13,92	9,18	13,95

Une dégradation de la consistance de l'échantillon de selle rencontrée chez les patients symptomatiques est présentée dans le Tableau 5. L'information est présentée pour la totalité des échantillons, d'une part, et uniquement pour les échantillons positifs, d'autre part.

**Tableau 5 : Consistance de l'échantillon de selle**

	Population totale N / %	Echantillons positifs N / %
Liquide	100 (11 %)	6 (5 %)
Molle	371 (41 %)	67 (55 %)
Semi-solide	263 (29 %)	35 (29 %)
Solide	150 (17 %)	11 (9 %)
Non classée	21 (2 %)	3 (2 %)

Microorganisme	Absorbance à 450 nm	
	Pour les selles négatives	Pour les selles positives
<i>Aeromonas hydrophilia</i> ATCC 7966	0,054 (-)	0,980 (+)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0,053 (-)	0,951 (+)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 33608	0,062 (-)	0,993 (+)
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	0,054 (-)	0,902 (+)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,053 (-)	0,920 (+)
<i>Clostridium botulinum</i> ATCC 17786	0,056 (-)	0,966 (+)
<i>Clostridium butyricum</i> ATCC 8260	0,057 (-)	0,904 (+)
<i>Clostridium histolyticum</i> ATCC 19401	0,055 (-)	0,959 (+)
<i>Clostridium innocuum</i> ATCC 14501	0,054 (-)	0,990 (+)
<i>Clostridium novyi</i> ATCC 19402	0,054 (-)	0,832 (+)
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	0,055 (-)	0,984 (+)
<i>Clostridium septicum</i> ATCC 12464	0,055 (-)	1,006 (+)
<i>Clostridium sordellii</i> VPI 9048	0,280 (+)	1,124 (+)
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 3584	0,057 (-)	0,858 (+)
<i>Clostridium subterminale</i> ATCC 29748	0,058 (-)	0,891 (+)
<i>Clostridium tetani</i> ATCC 19406	0,057 (-)	0,839 (+)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,053 (-)	0,903 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	0,058 (-)	0,884 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43889	0,057 (-)	0,297 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43894	0,056 (-)	0,312 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43895	0,058 (-)	0,281 (+)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	0,061 (-)	0,808 (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14207	0,056 (-)	0,835 (+)
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	0,051 (-)	0,838 (+)
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 29027	0,054 (-)	0,942 (+)
<i>Shigella flexnerii</i> ATCC 12661	0,053 (-)	0,941 (+)
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	0,056 (-)	0,969 (+)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598	0,051 (-)	1,069 (+)
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 11623	0,052 (-)	0,944 (+)
<i>Vibrio parahemolyticus</i> ATCC 17802	0,053 (-)	0,799 (+)
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	0,056 (-)	1,016 (+)

**Réaction croisée :** le test **Culturette** Toxin CD réagit avec toutes les souches de référence toxigènes connues de *C. difficile*.<sup>15</sup> Le test n'a pas réagi avec la souche non toxigène VPI 11186. La réactivité croisée s'est révélée négative avec les bactéries présentées dans le Tableau 6. Le test a été réalisé en prenant des selles positives et négatives contenant la toxine A de *C. difficile* et en ajoutant les divers organismes jusqu'à une concentration finale de 10<sup>7</sup> à 10<sup>9</sup> UFC/mL de selle. Comme prévu, le seul organisme connu pour provoquer une réaction croisée dans le test est un isolat fortement toxigène de *Clostridium sordellii* VPI 9048. Cet isolat fabrique des quantités importantes de toxines hémorragiques et létales dont la similarité immunologique et biologique aux toxines A et B de *C. difficile* a été montrée. Le *Staphylococcus aureus* de souche Cowan ATCC 12598 qui produit la protéine A, n'a pas révélé d'activité croisée. Par conséquent, *Escherichia coli* ATCC 43889, 43894 et 43895 qui produisent des toxines ressemblant aux toxines de Shiga, n'ont pas montré de réactivité croisée.

#### MATERIEL DISPONIBLE

N° cat.	Description
254004	<b>Culturette</b> Toxin CD, trousse pour 96 tests.
264001	<b>Culturette CDT</b> , test rapide au latex pour le <i>C. difficile</i> , trousse pour 25 tests.
273310	Embouts de pipettes, boîte de 1000.

**BIBLIOGRAPHIE :** voir la rubrique "References" du texte anglais.



# BD Culturette Toxin CD

Deutsch

CLIA KOMPLEXITÄT: HOHE  
 CDC IDENTIFIZIERUNGSCODES  
 ANALYTE: 1022  
 TESTSYSTEM: 07486, 07487

**VERWENDUNGSZWECK**

Der **Culturette** Toxin CD-Test ist ein schneller 70-Min-Enzym-Immunoassay (EIA) zum Nachweis von *Clostridium difficile*-Toxin A (Enterotoxin) in Humanstuhl. Der Test dient zur Diagnose von Erkrankungen durch *C. difficile*.

**ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG**

*C. difficile* ist ein wichtiger Erreger der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe, die in ihrer schwersten Form zum klinischen Syndrom der pseudomembranösen Kolitis mit hoher Sterblichkeitsrate führen kann. Obwohl *C. difficile* gelegentlich in der normalen Bakterienflora des Darms zu finden ist, kann es nach einer Antibiotikatherapie und einer daraus folgenden Veränderung der physiologischen Darmflora zu einem opportunistischen Krankheitserreger werden. Unter geeigneten Bedingungen produzieren toxinbildende *C. difficile*-Stämme zwei Toxine – Toxin A, ein gewebschädigendes Enterotoxin und Toxin B, ein *in-vitro*-Zytotoxin.<sup>1</sup> Gegenwärtiger Literatur zufolge werden Toxin A und Toxin B gleichzeitig produziert.<sup>2</sup> Es wird vermutet, daß die mit der Krankheit assoziierten klinischen Symptome in erster Linie durch Toxin A verursacht werden; bis heute bestehen keine überzeugenden Anhaltspunkte für eine bedeutende biologische Aktivität von Toxin B in natürlich auftretenden Erkrankungen.<sup>3</sup>

Die am häufigsten verwendeten klinischen Methoden zur Diagnose der durch *C. difficile* verursachten Antibiotika-assoziierten Kolitis waren bisher der Zytotoxin-Nachweis mittels Zellkultur (CTA) und Latex-Agglutinationsassays (LA).<sup>4</sup> Der CTA-Assay weist Toxin B aufgrund seiner zytopathischen Wirkung auf Zellkulturen nach. Dieser Test ist zwar sehr empfindlich, erfordert jedoch mindestens 2 Tage zur Durchführung. Der Latex-Agglutinationstest weist nicht die spezifischen Toxine sondern die Antigene von *C. difficile* nach, wird jedoch als ein wertvoller Schnelltest zur Bestimmung der Erregerrolle von *C. difficile* bei diarrhoischen Patienten betrachtet.<sup>5</sup> Keiner dieser zwei Assays weist Toxin A, den mutmaßlichen Erreger der Krankheit nach.

**VERFAHRENSGRUNDLAGEN**

Der **Culturette** Toxin CD-Test verwendet an Vertiefungen von Mikrotiterplatten gebundene Antitoxin A Capture-Antikörper. Die Patientenprobe und ein enzymgekoppelter Antitoxin A Nachweis-Antikörper werden in die Mikrotitervertiefungen gegeben und eine Std. bei 35 bis 37 °C inkubiert. Wenn Toxin A vorhanden ist, wird ein reaktiver Antitoxin-Enzymkomplex gebildet. Nach einem Waschvorgang zur Entfernung von ungebundenem Konjugat werden ein Substrat und ein Chromogen zugegeben und 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Gegenwart von gebundenem Enzym wird ein Farbstoff gebildet. Die Reaktionen werden visuell oder, falls erwünscht, spektralphotometrisch abgelesen.

**REAGENZIEN**

**Culturette** Toxin CD-Kit:

<b>Reagenz 1</b>	(20,0 mL)	Probenpuffer, Proteinstabilisator, mit 0,02 % Thimerosal (Konservierungsmittel).
<b>Reagenz 2</b>	(10,0 mL)	Konjugat, gegen <i>C. difficile</i> Toxin A gerichtete, an Meerrettichperoxidase gekoppelte, polyklonale Kaninchen-Antikörper in einem gepufferten Proteinstabilisator, mit 0,01 % Thimerosal (Konservierungsmittel).
<b>Reagenz 3</b>	(225,0 mL)	Waschreagenz, nicht-reaktives Detergenz in entionisiertem Wasser.
<b>Reagenz 4</b>	(10,0 mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Reagenz, Pufferlösung mit Wasserstoffperoxid.
<b>Reagenz 5</b>	(10,0 mL)	TMB-Reagenz, Lösung mit Tetramethylbenzidin.
<b>Reagenz 6</b>	(10,0 mL)	Stoppreagenz, 1,0 N Schwefelsäure. <i>Vorsicht:</i> Kontakt mit der Haut vermeiden; bei Kontakt Haut sofort mit Wasser abspülen.
<b>Kontrolle -</b>	(1,9 mL)	Nicht reaktives Kontrollserum, enthält Proteinstabilisatoren und 0,02 % Thimerosal (Konservierungsmittel).
<b>Kontrolle +</b>	(1,9 mL)	Schwach reaktives Kontrollserum, enthält inaktiviertes <i>C. difficile</i> -Toxin A, Proteinstabilisatoren und 0,01 % Thimerosal (Konservierungsmittel).
<b>Kontrolle ++</b>	(1,9 mL)	Stark reaktives Kontrollserum, enthält inaktiviertes <i>C. difficile</i> -Toxin A, Proteinstabilisatoren und 0,01 % Thimerosal (Konservierungsmittel).

Mikrotiterstreifen beschichtet mit polyklonalen, gegen *C. difficile* Toxin A gerichtete Kaninchen-Antikörpern.

**Sicherheitshinweise:** *In-vitro*-Diagnostikum.

Nach einer Prüfung seitens der U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) und der U.S. Food and Drug Administration (FDA) gemäß CLIA '88 wurde dieses Produkt als ein Produkt hoher Komplexität identifiziert. Der CDC Analyte-Identifizierungscode (Analyte Identifier Code) ist 1022; der CDC Testsystem-Identifizierungscode (Test System Identifier Code) ist 07486 (visuell) und 07487 (spektrophotometrisch).

**Reagenzien:** Verfallsdatum beachten. Reagenzien vor Gebrauch aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur erwärmen. AUSSCHLIESSLICH Reagenzien derselben Chargen-Nr. verwenden.

**Reagenzien 4 und 5** dürfen nicht für längere Zeit starkem Licht ausgesetzt werden.

Zum Einstellen einer exakten Tropfengröße muß das Tropffläschchen beim Auftragen senkrecht über der Mikrotitervertiefung gehalten werden, so daß nur ein freifallender Tropfen auf einmal aufgetragen wird.

Hautkontakt mit **Reagenz 6** (1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) vermeiden. Bei Kontakt Haut sofort mit Wasser abspülen.

**Kontrollen:** Das Kit nicht verwenden, wenn positive und negative Kontrollen falsche Ergebnisse liefern. Positive Kontrollen werden aus inaktiviertem Toxin A-Antigen hergestellt; sie sind jedoch wie potentiell gefährliches biologisches Material zu handhaben.

**Transferpipetten:** Nur zum Einmalgebrauch; nicht wiederverwenden.

**Aufbewahrung der Reagenzien:** Die Reagenzien nach Erhalt bei 2 bis 8 °C kühl aufbewahren. NICHT EINFRIEREN. Reagenzienfläschchen nach Gebrauch wieder verschließen und im Kühlschrank aufbewahren. Darauf achten, daß die farbigen Deckel nicht vertauscht werden.

**Reagenz 3** (Waschreagenz) kann entweder bei Raumtemperatur mit dem Originalverschluß oder bei 2 bis 8 °C aufbewahrt werden. **Vor Gebrauch 90 Minuten lang auf Raumtemperatur erwärmen lassen.**

**Mikrotiterplatten:** Nur zum Einmalgebrauch. Die unter "Durchführung des Tests" angegebene Anleitung zum Waschen der Mikrotitervertiefungen genau beachten. Unsachgemäßes Waschen kann zu erhöhten Leerwerten oder willkürlicher Farbentwicklung bei Toxin-A-negativen Proben führen.

Die Mikrotiterplatten sind in einem wiederverschließbaren, zum Schutz der Platten gegen Feuchtigkeit entwickelten Folienbeutel verpackt. Den Beutel gemäß der Anleitung unter "Testverfahren" öffnen. Die Mikrotiterplatten im wiederverschließbaren Folienbeutel belassen, bis der Beutel Raumtemperatur erreicht hat. Nicht benötigte Mikrotiterplatten sofort in den wiederverschließbaren Beutel mit dem Trockenmittel zurückgeben, erneut verschließen und im Kühlschrank aufbewahren.

#### PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG

Die Stuhlproben in einem sauberen luftdichten Behälter ohne Konservierungsmittel sammeln. Die Proben sollten möglichst schnell nach Erhalt im Labor getestet werden; sie können jedoch bis zu 48 Std. bei 2 bis 8 °C aufbewahrt werden. Falls die Proben erst nach 48 Std. getestet werden, müssen sie sofort nach Erhalt im Labor bei -70 °C eingefroren werden. Obwohl bei der Mehrzahl der positiven Proben die nachweisbare Toxin A-Menge nach einmaligem Einfrieren und Abtauen nur leicht oder überhaupt nicht abnimmt,<sup>6</sup> sind frische Proben vorzuziehen.

Stuhlproben vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen und möglichst gründlich mischen.

**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"<sup>7-10</sup> sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten.

Entsprechend den Grundregeln guter Labortechnik während der Durchführung des Tests Einmalhandschuhe tragen und danach gründlich die Hände waschen.

Alle für die Durchführung des Test verwendeten Materialien 60 Min bei 121 °C im Autoklaven sterilisieren oder 30 Min mit 0,05 % Natriumhypochlorit-Lösung (1:100 verdünnte Haushaltsbleiche) behandeln. *Materialien, die Natriumhypochlorit enthalten, nicht autoklavieren.* **ACHTUNG:** Flüssigabfälle, die Schwefelsäure enthalten, müssen vor der Hypochloritbehandlung zuerst neutralisiert werden (z.B. mit 1 N Natriumbikarbonat).

Die wiederverwendbare Haltevorrichtung für die Mikrotiterstreifen kann zwischen Tests mit 0,05 % Natriumhypochlorit-Lösung wie oben beschrieben dekontaminiert werden.

#### VERFAHREN

**Mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Alle unter "Reagenzien" aufgeführten Materialien, Arbeitsstation, Plastik-Transferpipetten, Haltevorrichtung für Mikrotiterstreifen, Abdichtfolie für Mikrotiterstreifen, Schablone zur Probenidentifizierung und Zubehör.

**Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Ein 35 bis 37 °C Brutschrank, verschließbare Plastik- oder Glas-Teströhrchen (12 x 75 mm) zur Probenverdünnung, Vortex-Mischer, EIA-Ablesegerät zum Messen von Extinktionen bei 450 nm oder 450/630 nm (fakultativ).

Ferner werden die zur Vorbereitung, Lagerung und Verarbeitung von klinischen Blutproben verwendeten Geräte und Laborutensilien benötigt.

**Durchführung des Tests:** Vor der Durchführung des Tests die Abschnitte "Sicherheitshinweise" sowie "Probenentnahme und Handhabung" gut durchlesen. Die Testfläche, alle Reagenzien, das gesamte Untersuchungsmaterial sowie die Verbrauchsmaterialien sollten bei Gebrauch Raumtemperatur aufweisen.

Sicherstellen, daß sich die Reagenzien in den dafür vorgesehenen Vertiefungen der Arbeitsstation befinden. Den Flaschenverschluß von **Reagenz 3** (Waschreagenz) gegen den mitgelieferten Spritzaufsatz auswechseln. Nach Beendigung der täglichen Tests sollte der Spritzaufsatz wieder gegen den Original-Flaschenverschluß ausgetauscht werden.

Vor Verwendung alle Reagenzien durch Umdrehen vorsichtig mischen. Schaumbildung vermeiden.

**Vorbereitung der Proben:**

1. Mit einer geeichten Mikropipette oder einer Transferpipette (bis zur zweiten Markierung von der Spitze der Pipette) 200 µL **Reagenz 1** (Probenpuffer) in ein sauberes Röhrchen (12 x 75 mm) pipettieren.

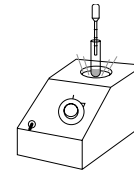


2. Stuhlprobe so gründlich wie möglich mischen.

- a. *Flüssiger, ungeformter oder halbfester Stuhl:* Mit einer Transferpipette 100 µL (bis zur ersten Markierung) Probenmaterial in das Röhrchen mit **Reagenz 1** übertragen. Den Inhalt des Röhrchens durch 2- bis 3 maliges Aufziehen und Entleeren der gleichen Transferpipette mischen.



Die Transferpipette im Röhrchen belassen und den Inhalt bei mäßiger Geschwindigkeit 15 Sek homogenisieren.



- b. *Fester Stuhl:* Mit einem Holzspatel etwa 200 mg (5 – 6 mm Durchmesser, "Erbsengröße") in das Röhrchen mit **Reagenz 1** übertragen. Die Probe emulgieren und den Holzspatel in einen Behälter für biologischen Abfall werfen.

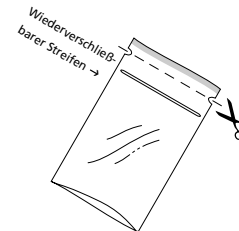
Probe bei mäßiger Geschwindigkeit 15 Sek homogenisieren und eine Transferpipette in das Röhrchen stellen.



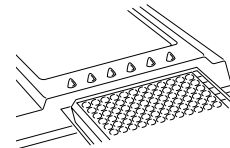
**Hinweis:** Stuhlproben nach Verdünnung mit **Reagenz 1** möglichst schnell untersuchen.

**Vorbereitung der Mikrotiterplatten:**

1. Den Folienbeutel mit den Mikrotiterplatten durch Aufreißen oder Aufschneiden entlang den Einkerbungen zwischen der Hitzeversiegelung und dem wiederverschließbaren Streifen öffnen und den Inhalt entfernen.



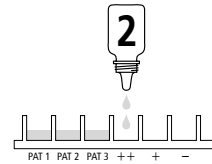
2. Mittels der Knopfreihe an der Vorderseite der Arbeitsstation alle Mikrotiterstreifen aus der Haltevorrichtung entfernen.



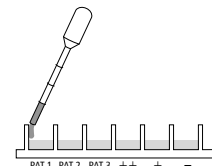
3. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterplatten (eine pro Patient und zusätzlich 3 Kontrollen pro Charge) abtrennen und in die Haltevorrichtung für die Streifen einsetzen.
4. Alle nicht benötigten Mikrotiterplatten in den wiederverschließbaren Beutel zurückgeben, **erneut verschließen** und im Kühlschrank aufbewahren.
5. Die Position jeder Vertiefung anhand der Schablone zur Identifizierung der Proben bestimmen.

**Testverfahren:**

1. Allen Mikrotitervertiefungen 2 freifallende Tropfen **Reagenz 2** (Konjugat) zugeben.

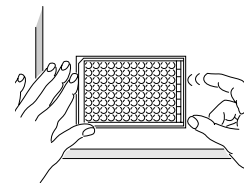


2. Mit der Transferpipette oder einer kalibrierten Mikropipette 100 µL verdünnten Stuhl (bis zur ersten Markierung) aufziehen und die Probe langsam entlang der Seite in die entsprechende Mikrovertiefung fließen lassen. Die Transferpipette oder Mikropipettenspitze in einen Behälter für biologischen Abfall werfen.

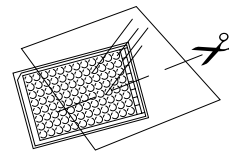


3. Mit einer neuen Transferpipette oder Mikropipettenspitze für jede Kontrolle 100 µL **Kontrolle ++**, **Kontrolle +** und **Kontrolle -** aufziehen und entlang der Seite in die entsprechenden Mikrotitervertiefungen fließen lassen.

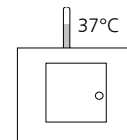
4. Den Inhalt der Mikrotiterplatten durch 10-Sek-langes leichtes Aufklopfen der Platte auf eine feste Fläche mischen.



5. Die Abdichtfolie für die Mikrotiterstreifen passend zuschneiden und fest über den Vertiefungen andrücken.

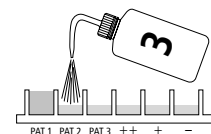


6. Die Platte 60 Min in einem 35 bis 37 °C Brutschrank inkubieren.  
**Hinweis:** Die richtige Temperatur im Inkubator muß während der einstündigen Inkubationszeit gewährt sein.



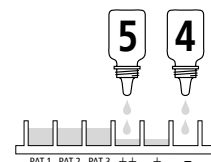
7. Die Abdichtfolie vorsichtig entfernen und die Mikrotiterplatte mit **Reagenz 3** (Waschreagenz) folgendermaßen waschen:

- a. Mikrotiterplatte durch Umdrehen (oder Absaugen) in einen Behälter für biologischen Abfall ENTLÉEREN.
- b. Die umgedrehte Platte FEST auf saubere Papiertücher auf einer festen Unterlage AUFKLOPFEN.
- c. Jede Mikrovertiefung mit **Reagenz 3** (Waschreagenz) FÜLLEN, entleeren (oder absaugen) und die umgedrehte Platte fest auf saubere Papiertücher aufklopfen.
- d. Schritt "c" 4mal WIEDERHOLEN.



- e. Nach dem letzten Waschen die umgedrehten Platten kräftig genug auf saubere Papiertücher aufklopfen, um die größtmögliche Menge an überschüssigem **Reagenz 3** zu entfernen, *ohne die Streifen abzulösen*. Die Mikrotitervertiefungen dürfen zu keiner Zeit völlig austrocknen.

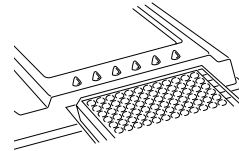
8. Unterseite aller Mikrotiterplatten mit einem fusselfreien Tuch reinigen.
9. Jeder Mikrovertiefung 2 freifallende Tropfen **Reagenz 4** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), und anschließend 2 freifallende Tropfen **Reagenz 5** (TMB) zugeben.



10. Den Inhalt der Mikrotitervertiefungen durch 10 Sek langes leichtes Aufklopfen der Platte auf einer festen Fläche mischen und 10 Min bei Raumtemperatur inkubieren.

**Ablesen der Testergebnisse:**

1. Zur visuellen Bestimmung der Ergebnisse die blaue Farbe innerhalb von 5 Min ablesen (nach der in Schritt 10 beschriebenen 10-minütigen Inkubationszeit). Wenn zum visuellen Ablesen gelbe Farbe bevorzugt wird, unmittelbar nach der in Schritt 10 beschriebenen 10-minütigen Inkubationszeit jeder Mikrotitervertiefung zwei Tropfen **Reagenz 6** (Stoppreagenz) zugeben, 10 Sek lang vorsichtig aufklopfen und die gelbe Farbe 10 Min nach der Zugabe von **Reagenz 6** ablesen.
2. Zur Bestimmung der Ergebnisse mittels eines EIA-Ablesegeräts die Unterseite aller Mikrotiterplatten reinigen, das EIA-Gerät mit Luft (ohne Mikrotiterplatten) auf Null einstellen und die Extinktion bei 450 nm oder 450/630 nm innerhalb von 10 Min nach Zugabe von **Reagenz 6** ablesen.
3. Nach Beendigung der Tests können die Mikrotiterstreifen aus der Halterung entfernt werden. Dazu die Halterung gegen die Knopfriehe an der Vorderseite der Arbeitsstation drücken. Verwendete Mikrotitervertiefungen gemäß der Beschreibung unter "Probenentnahme und Handhabung" verwerfen.



**Qualitätskontrolle:** Die **Kontrolle +** (schwach reaktives Kontrollserum) und die **Kontrolle -** sollten bei jeder Charge von Patientenproben zur Bestätigung der Reaktivität der Reagenzien und ordnungsgemäßer Verfahrenstechnik mitgeführt werden. Die **Kontrolle ++** (stark reaktives Kontrollserum) wird ebenfalls mitgeliefert und kann fakultativ zur Bestätigung von zwei positiven Reaktionsniveaus verwendet werden. Dies ist als zusätzliche Bestätigung für einen korrekt ausgeführten Test von besonderem Wert, wenn die Ergebnisse visuell abgelesen werden.

Falls die positive und die negative Kontrolle nicht die erwarteten Ergebnisse liefern (s. Tabelle), können die Ergebnisse der Patientenprobe nicht verwendet werden.

	VISUELL	450 nm	450/630 nm
Kontrolle ++	Starke Farbentwicklung (blau oder gelb)	>1,500	>1,455
Kontrolle +	Mäßige Farbentwicklung (blau oder gelb)	0,300 – 1,000	0,250 – 0,900
Kontrolle -	Farblos	<0,100	<0,070

Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die laborinternen Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Es wird empfohlen, daß der Benutzer die einschlägigen NCCLS Leitfäden und CLIA Regelungen über geeignete Verfahren zur Qualitätskontrolle heranzieht.

**AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**

Die Gestaltung des **Culturette** Toxin CD-Tests gestattet visuelles Ablesen der blauen Farbe nach Schritt 10 ("Testverfahren") oder alternativ dazu, der gelben Farbe nach Zugabe von **Reagenz 6**. Der Test kann ebenso mit einem EIA-Gerät abgelesen werden.

- |   |   |
|---|---|
| <p>1. <b>Visuelles Ablesen der blauen Farbe:</b><br/>Negativ = Farblos<br/>Positiv = Blaue Farbe <b>jeglicher</b> Intensität</p>                        | <p>3. <b>EIA-Ablesegerät, eine Wellenlänge (450 nm):</b><br/>Negativ = <math>OD_{450} &lt; 0,1</math><br/>Zweideutig = <math>OD_{450} \geq 0,1</math>, jedoch <math>&lt; 0,15</math><br/>Positiv = <math>OD_{450} \geq 0,15</math></p>                        |
| <p>2. <b>Visuelles Ablesen der gelben Farbe (Zugabe von Reagenz 6):</b><br/>Negativ = Farblos<br/>Positiv = Gelbe Farbe <b>jeglicher</b> Intensität</p> | <p>4. <b>EIA-Ablesegerät, zwei Wellenlängen (450/630 nm):</b><br/>Negativ = <math>OD_{450/630} &lt; 0,070</math><br/>Zweideutig = <math>OD_{450/630} \geq 0,070</math>, jedoch <math>&lt; 0,100</math><br/>Positiv = <math>OD_{450/630} \geq 0,100</math></p> |

Wird zur Interpretation der Reaktionen ein EIA-Ablesegerät verwendet, müssen zweideutig ausfallende Tests wiederholt werden. Falls die Ergebnisse danach immer noch zweideutig sind, muß eine frische Patientenprobe entnommen und getestet werden. Werden die Reaktionen visuell abgelesen, so sollten sie bei Farbentwicklung jeglicher Intensität als positiv vermerkt werden. Farblose Reaktionen sollten als negativ interpretiert werden.

**Hinweis:** Extrem stark-positive Reaktionen produzieren gelegentlich ein dunkelbraunes Präzipitat innerhalb von 5 – 10 Min nach Zugabe von **Reagenz 6**. Die Testergebnisse werden dadurch jedoch nicht beeinflusst.

**VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN**

Der **Culturette** Toxin CD-Test weist in Humanstuhl vorhandenes Toxin A nach. Da zwischen der vorliegenden Menge Toxin A und dem Auftreten oder der Schwere der Erkrankung bisher kein definitiver Zusammenhang nachgewiesen wurde, müssen die Testergebnisse von einem Arzt unter Berücksichtigung klinischer und anderer Laborbefunde beurteilt werden.

Einige Isolate von *Clostridium sordellii* produzieren nachweislich ein hämorrhagisch wirkendes Toxin (HT), das Toxin A-ähnliche biologische, biochemische und immunochemische Eigenschaften besitzt. Das HT kann bei Prüfungen auf Toxin A gelegentlich Kreuzreaktionen verursachen.<sup>4</sup> In Patienten mit Antibiotika-assoziiertes

Diarrhoe und Kolitis wurden bislang keine *C. sordellii*-Stämme nachgewiesen. *C. difficile*-Toxine können im Stuhl von Kindern und Patienten mit zystischer Fibrose vorhanden sein, ohne eine klinische Bedeutung zu haben.<sup>11,12</sup>

Wie bei anderen Tests ist die Handhabung der Proben wichtig zur Erhaltung der Toxin A-Titer. Es wird empfohlen die Proben bei -70 °C einzufrieren, falls sie nicht unverzüglich getestet werden (S. "Probenentnahme und Handhabung").

#### ERWARTETE WERTE

*Clostridium difficile* ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der seine toxische Wirkung ausübt, wenn der Darmtrakt auf irgendeine Weise geschwächt ist, wie z.B. unter Antibiotikatherapie. Daher werden Patienten kurz nach einer Antibiotikatherapie oder unter Dauertherapie stehende Patienten am häufigsten infiziert. Stuhluntersuchungen auf Toxine können in bis zu 1 % der Kulturen gesunder Erwachsener positiv ausfallen.<sup>13</sup> Die Häufigkeit von Nosokomialinfektionen kann, abhängig von der Einrichtung, der Abteilung, krankenhaushygienischen Praktiken und der Patientenpopulation, unterschiedlich sein.<sup>13,14</sup> Der **Culturette** Toxin CD-Test lieferte positive Ergebnisse in 3,8 % bis 18,5 % symptomatischer Patienten.<sup>15</sup> Höhere oder niedrigere positive Werte sind durchaus möglich.

#### LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistung des **Culturette** Toxin CD-Tests wurde anhand prospektiver Studien bestimmt, die von 4 bedeutenden, in geographisch unterschiedlichen Gebieten der USA gelegenen, unabhängigen medizinischen Zentren durchgeführt wurden. Für diese Studien wurden insgesamt 905 speziell zur Untersuchung auf *C. difficile* Zytotoxin B eingesandte frische Stuhlproben symptomatischer Patienten mit Verdacht auf *C. difficile*-assoziierte Erkrankungen verwendet. Die durchschnittliche Häufigkeitsrate von *C. difficile* in den getesteten Patientenproben betrug 13 % (zwischen 4 % und 20 %). Als Referenzwerte wurden vorwiegend die Ergebnisse von Zytotoxin B-Tests herangezogen. Proben mit widersprüchlichen Ergebnissen wurden erneut in Parallelbestimmung getestet und, falls diese immer noch zweideutig war, wurden die Ergebnisse des **Culturette** Toxin CD-Tests auf Übereinstimmung mit einem charakteristischen Profil verglichen. Das Profil wurde mit Kriterien aus der klinischen Diagnose, Ergebnissen von toxischen Kulturen und anderen zur Verfügung stehenden Testinformationen gebildet. Die Ergebnisse der Studie sind in Tabelle 1 dargestellt, wobei der **Culturette** Toxin CD-Test mit einem EIA-Gerät abgelesen wurde. Die in den Tabellen 2 und 3 dargestellten Ergebnisse wurden visuell anhand der blauen bzw. gelben Farbe abgelesen. Die Leistungsfähigkeit des **Culturette** Toxin CD-Tests betrug, abhängig von der verwendeten Ablesemethode und dem Referenzwert, 87 – 92 % (Empfindlichkeit) und 95 – 98 % (Spezifität). Zweideutige Ergebnisse wurden bei der Ermittlung der Empfindlichkeit und der Spezifität nicht berücksichtigt.

Tabelle 1

Vergleich zwischen **Culturette** Toxin CD-Testergebnissen (bei Verwendung eines EIA-Geräts) und Zytotoxin-Testergebnissen sowie Zytotoxin-Testergebnissen einschließlich Ergebnis des Wiederholungstests.

Culturette Toxin CD	Zytotoxin Testergebnis		Zytotoxin-Testergebnis einschl Ergebnis des Wiederholungstests	
	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Positiv	99	24	110	12
Negativ	17	732	9	760
Zweideutig	5	19	2	3

*Empfindlichkeit	85 %	<b>92 %</b>
*Spezifität	97 %	<b>98 %</b>
Positiver Voraussagewert	80 %	<b>89 %</b>
Negativer Voraussagewert	98 %	<b>99 %</b>
Zweideutig	3 %	<b>&lt;1 %</b>
Genauigkeit	93 %	<b>97 %</b>
**Gesamtanzahl	896	<b>896</b>

Tabelle 2

Vergleich zwischen **Culturette** Toxin CD-Testergebnissen (bei visuellem Ablesen des blauen Farbstoffs) und Zytotoxin-Testergebnissen

Culturette Toxin CD	Zytotoxin-Testergebnis	
	Positiv	Negativ
Positiv	103	21
Negativ	15	727

*Empfindlichkeit	87 %
*Spezifität	97 %
Positiver Voraussagewert	83 %
Negativer Voraussagewert	98 %
Genauigkeit	95 %
***Gesamtanzahl	871

**Tabelle 3**  
**Vergleich zwischen Culturette Toxin CD-Testergebnissen**  
**(bei visuellem Ablesen des gelben Farbstoffs) und Zytotoxin-Testergebnissen**

Culturette Toxin CD	Zytotoxin-Testergebnis	
	Positiv	Negativ
Positiv	104	37
Negativ	14	710

*Empfindlichkeit	88 %
*Spezifität	95 %
Positiver Voraussagewert	74 %
Negativer Voraussagewert	98 %
Genauigkeit	93 %
***Gesamtanzahl	871

\*Arithmetische Mittelwerte basieren auf der Anzahl der in jedem Testlabor getesteten positiven oder negativen Proben im Verhältnis zur Gesamtanzahl der getesteten Proben.

\*\*Spektralphotometrisch abgelesene Ergebnisse von 9 Proben wurden nicht dokumentiert.

\*\*\*Visuell abgelesene Ergebnisse von 34 Proben wurden nicht dokumentiert.

Die Reproduzierbarkeit des Assays wurde anhand von 3 Kontrollproben sowohl mit hohem und niedrigem Toxin A-Gehalt als auch ohne Toxin A-Gehalt geprüft. Die beim Ablesen bei einer und zwei verschiedenen Wellenlängen erhaltenen positiven und negativen Ergebnisse stimmten zu 100 % überein. Die Intra- und Interassay-Präzision bei flüssigen Stuhlproben ist in der untenstehenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 4: Culturette Toxin CD Assay-Präzision**

Probe	Mittelwert 1 Wellenlänge	Mittelwert 2 Wellenlängen	% VK Intraassay 1 Wellenlänge	% VK Interassay 1 Wellenlänge	% VK Intraassay 2 Wellenlängen	% VK Interassay 2 Wellenlängen
Kontrolle -	0,0440	0,0075	4,34	4,77	10,6	18,67
Kontrolle +	0,6692	0,6285	7,6	10,55	8,06	11,06
Kontrolle ++	2,38	2,32	9,23	13,92	9,18	13,95

Tabelle 5 enthält eine Klassifizierung der Stuhlbeschaffenheit in Proben von symptomatischen Patienten. Die Werte wurden hinsichtlich der Gesamtanzahl der Proben erstellt und gelten ausschließlich für positive Proben.

**Tabelle 5: Konsistenz der Stuhlproben**

	Gesamtanzahl Population Anzahl/%	Positive Proben Anzahl/%
Flüssig	100 (11 %)	6 (5 %)
Ungeformt	371 (41 %)	67 (55 %)
Halbfest	263 (29 %)	35 (29 %)
Fest	150 (17 %)	11 (9 %)
Nicht klassifiziert	21 (2 %)	3 (2 %)

Mikroorganismus	Extinktion bei 450 nm	
	In negativen Stuhlproben	In positiven Stuhlproben
<i>Aeromonas hydrophilia</i> ATCC 7966	0,054 (-)	0,980 (+)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0,053 (-)	0,951 (+)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 33608	0,062 (-)	0,993 (+)
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	0,054 (-)	0,902 (+)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,053 (-)	0,920 (+)
<i>Clostridium botulinum</i> ATCC 17786	0,056 (-)	0,966 (+)
<i>Clostridium butyricum</i> ATCC 8260	0,057 (-)	0,904 (+)
<i>Clostridium histolyticum</i> ATCC 19401	0,055 (-)	0,959 (+)
<i>Clostridium innocuum</i> ATCC 14501	0,054 (-)	0,990 (+)
<i>Clostridium novyi</i> ATCC 19402	0,054 (-)	0,832 (+)
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	0,055 (-)	0,984 (+)
<i>Clostridium septicum</i> ATCC 12464	0,055 (-)	1,006 (+)
<i>Clostridium sordellii</i> VPI 9048	0,280 (+)	1,124 (+)
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 3584	0,057 (-)	0,858 (+)
<i>Clostridium subterminale</i> ATCC 29748	0,058 (-)	0,891 (+)
<i>Clostridium tetani</i> ATCC 19406	0,057 (-)	0,839 (+)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,053 (-)	0,903 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	0,058 (-)	0,884 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43889	0,057 (-)	0,297 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43894	0,056 (-)	0,312 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43895	0,058 (-)	0,281 (+)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	0,061 (-)	0,808 (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14207	0,056 (-)	0,835 (+)
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	0,051 (-)	0,838 (+)
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 29027	0,054 (-)	0,942 (+)
<i>Shigella flexnerii</i> ATCC 12661	0,053 (-)	0,941 (+)
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	0,056 (-)	0,969 (+)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598	0,051 (-)	1,069 (+)
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 11623	0,052 (-)	0,944 (+)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0,053 (-)	0,799 (+)
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	0,056 (-)	1,016 (+)

**Kreuzreaktivität:** Der **Culturette** Toxin CD-Test reagiert mit allen bekannten Referenzstämmen von *C. difficile*.<sup>15</sup> Der Test reagierte nicht mit dem nicht-toxischen VPI 11186-Stamm. Bei den in Tabelle 6 genannten Bakterien wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet. Zur Prüfung wurden *C. difficile* Toxin A-negative und positive Stuhlproben auf Endkonzentrationen zwischen 10<sup>7</sup> bis 10<sup>9</sup> KBE/ml Stuhl mit den verschiedenen Organismen gebracht. Wie erwartet ist der einzige Organismus, der nachweislich eine Kreuzreaktion zeigte, ein hoch-toxisches Isolat von *Clostridium sordellii* VPI 9048. Dieses Isolat produziert nachweislich große Mengen hämorrhagisch und letal wirkender Toxine, die ähnliche immunologische und biologische Eigenschaften besitzen wie die *C. difficile* Toxine A und B. Der *Staphylococcus aureus* Cowan-Stamm (ATCC 12598), der Protein A produziert, zeigte keine Kreuzreaktivität. Die *Escherichia coli* ATCC-Stämme 43889, 43894 und 43895, die ein shigella-ähnliches Toxin bilden, zeigten ebenfalls keine Kreuzreaktivität.

#### LIEFERBARE PRODUKTE

##### Best.-Nr. Beschreibung

- 254004 **Culturette** Toxin CD, Testkit für 96 Bestimmungen.  
 264001 **Culturette CDT** Latex-Schnelltest auf *C. difficile*, Testkit für 25 Bestimmungen.  
 273310 Pipettenspitzen, Karton mit 1000.

**LITERATURNACHWEIS:** S. "References" im englischen Text.



# BD Culturette Toxin CD

Italiano

**USO PREVISTO**

Il test **Culturette** Toxin CD è un dosaggio immunoenzimatico (EIA) rapido, della durata di 70 min per la determinazione qualitativa della tossina A (enterotossina) di *Clostridium difficile* in campioni di feci umani. Il test viene impiegato per la diagnosi delle malattie associate a *C. difficile*.

**SOMMARIO E SPIEGAZIONE**

*C. difficile* è un importante fattore nel causare la diarrea associata all'uso di antibiotici, che nei casi più gravi può provocare la colite pseudomembranosa ed elevata mortalità. Sebbene *C. difficile* possa far parte della normale flora batterica intestinale, esso può diventare un patogeno opportunista in seguito al trattamento del paziente con antibiotici e successiva alterazione della normale flora intestinale. Nelle condizioni adatte, i ceppi produttori di tossine di *C. difficile* producono due tipi di tossine – la tossina A, una enterotossina in grado di danneggiare i tessuti, e la tossina B, una citotossina *in vitro*.<sup>1</sup> Al momento attuale la letteratura riporta che sia la tossina A sia la tossina B vengono prodotte contemporaneamente.<sup>2</sup> Si ritiene che i sintomi clinici associati alla malattia siano dovuti prevalentemente alla tossina A, e al momento attuale non è stato ancora chiaramente dimostrato se la tossina B svolga un'attività biologica importante nella malattia spontanea.<sup>3</sup>

Il più comune ausilio alla diagnosi clinica di colite da *C. difficile* associata alla somministrazione di antibiotici è stata il test di citotossicità su colture cellulari (CTA) e il test di agglutinazione su lattice (LA).<sup>4</sup> Il test CTA è in grado di rilevare la tossina B mediante l'effetto citopatico su colture cellulari. Sebbene risulti assai sensibile, questo test richiede almeno due giorni per essere eseguito. Il test di agglutinazione su lattice è in grado di rilevare l'antigene di *C. difficile* piuttosto che le tossine specifiche, ma viene considerato come un valido test rapido al fine di definire il ruolo eziologico di *C. difficile* in pazienti affetti da diarrea.<sup>5</sup> Nessuno dei due test è in grado di rilevare la presenza della tossina A, la causa ipotizzata della malattia.

**PRINCIPI DELLA PROCEDURA**

Il test **Culturette** Toxin CD utilizza un anticorpo di cattura antitossina A adsorbito su micropozzetti. Ai micropozzetti vengono aggiunti il campione prelevato dal paziente e un anticorpo antitossina A coniugato con enzimi, e vengono incubati per 1 ora a 35 – 37° C. Se è presente la tossina A, si sviluppa un complesso enzimatico reattivo antitossina. Dopo un lavaggio per la rimozione del coniugato non legato, vengono aggiunti un substrato e un cromogeno, e incubati a temperatura ambiente per 10 minuti. In presenza dell'enzima legato si sviluppa una colorazione. Le reazioni vengono quindi valutate otticamente o, se si preferisce, lette allo spettrofotometro.

**REAGENTI**Kit **Culturette** Toxin CD:

<b>Reagente 1</b> (20,0 mL)	Tampone del campione, stabilizzatore proteico contenente 0,02% di timerosal (conservante).
<b>Reagente 2</b> (10,0 mL)	Anticorpo coniugato, anticorpo policlonale (di coniglio) specifico per la tossina A di <i>C. difficile</i> coniugato con perossidasi di rafano in un tampone stabilizzatore delle proteine contenente 0,01% di timerosal (conservante).
<b>Reagente 3</b> (225,0 mL)	Reagente di lavaggio, detergente non reattivo in acqua deionizzata.
<b>Reagente 4</b> (10,0 mL)	Reagente di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , soluzione tamponata contenente perossido di idrogeno.
<b>Reagente 5</b> (10,0 mL)	Reagente TMB, soluzione contenente tetrametilbenzidina.
<b>Reagente 6</b> (10,0 mL)	Soluzione di arresto, acido solforico 1,0 N. <b>Attenzione:</b> Evitare il contatto con la cute; se si verifica contatto con la cute, lavare immediatamente con acqua.
<b>Controllo -</b> (1,9 mL)	Controllo negativo, contiene stabilizzatori delle proteine e 0,02% di timerosal (conservante).
<b>Controllo +</b> (1,9 mL)	Controllo basso positivo, contiene tossina A di <i>C. difficile</i> inattivata, stabilizzatori delle proteine e 0,01% di timerosal (conservante).
<b>Controllo ++</b> (1,9 mL)	Controllo alto positivo, contiene tossina A di <i>C. difficile</i> inattivata, stabilizzatori delle proteine e 0,01% di timerosal (conservante).

Strisce di micropozzetti rivestiti di anticorpi policlonali di coniglio specifici per la tossina A di *C. difficile*.

**Precauzioni:** Per uso diagnostico *in vitro*.

**Reagenti:** Non usare oltre la data di scadenza. Dopo averli tolti dal frigorifero, portare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso. **NON MESCOLARE** reagenti appartenenti a kit con diversi numeri di lotto.

Evitare l'esposizione prolungata dei **Reagenti 4 e 5** a luce intensa.

Per assicurare la dispensazione di una goccia di dimensioni adeguate, i flaconi dispensatori devono essere tenuti in posizione verticale sopra il pozzetto durante l'erogazione, dispensando una goccia per volta a caduta libera.

Evitare il contatto con la cute con il **Reagente 6** (1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Se si verifica contatto, lavare immediatamente con acqua.

**Controlli:** Non utilizzare il kit se i controlli positivo e negativo non danno risultati appropriati. I controlli positivi sono costituiti da antigene di tossina A inattivata; devono comunque essere manipolati come materiale potenzialmente a rischio biologico.

**Pipette di trasferimento:** Monouso; non utilizzare una seconda volta.

**Conservazione dei reagenti:** Al ricevimento, conservare i reagenti tra 2 e 8 °C. NON CONGELARE. Dopo l'uso chiudere i flaconi dei reagenti col rispettivo tappo (facendo attenzione a non confondere tappi di diverso colore) e riporli in frigorifero.

Il **Reagente 3** (lavaggio) può essere conservato a temperatura ambiente (con il suo tappo) o a 2 – 8 °C. **Dopo la refrigerazione attendere 90 min per consentire al reagente di raggiungere la temperatura ambiente.**

**Micropozzetti:** Non utilizzare una seconda volta. Eseguire il lavaggio dei micropozzetti esattamente come descritto nel paragrafo "Esecuzione del test". Un lavaggio non adeguato può determinare la comparsa di un fondo elevato, o lo sviluppo casuale di colore nei campioni negativi di tossina A.

I micropozzetti sono contenuti in un sacchetto di carta laminata sigillabile studiato per proteggere le strisce dall'umidità. Il sacchetto deve essere aperto come descritto nel paragrafo "Procedura". Conservare i micropozzetti nel sacchetto di carta laminata sigillabile finché quest'ultimo raggiunge la temperatura ambiente. Riporre immediatamente tutti i micropozzetti non utilizzati nel sacchetto di carta laminata sigillabile contenente il desiccante, richiudere e riporre nel frigorifero.

#### RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Raccogliere i campioni di feci in un contenitore ermetico pulito senza conservanti. Il dosaggio dei campioni deve essere eseguito appena possibile dopo l'arrivo in laboratorio; la conservazione è comunque consentita fino a 48 h alla temperatura di 2 – 8 °C. Se i campioni devono essere sottoposti al test dopo 48 h, devono essere immediatamente congelati a -70 °C dopo l'arrivo in laboratorio. Sebbene la maggior parte dei campioni positivi presentino una minima o nulla riduzione di tossina A dopo un ciclo di congelamento-scongelo, è preferibile utilizzare campioni freschi.

Consentire ai campioni di feci di raggiungere la temperatura ambiente e mescolare accuratamente prima dell'uso.

**AVVERTENZA:** I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e il virus dell'immunodeficienza umana. Nel maneggiare qualsiasi oggetto contaminato con sangue o altri liquidi biologici, occorre attenersi alle direttive del presidio locale e alle "precauzioni standard".<sup>7-10</sup>

Rispettando le buone norme di laboratorio, indossare guanti monouso durante tutto il dosaggio e al termine lavarsi accuratamente le mani.

Eliminare tutti i materiali utilizzati per l'esecuzione del test mediante autoclavaggio per 60 min a 121 °C o mediante trattamento con una soluzione allo 0,05% di sodio ipoclorito per 30 min (1:100 diluizione di una candeggina comune). *Non autoclavare materiali contenenti sodio ipoclorito.* **ATTENZIONE:** I residui liquidi contenenti acido solforico devono essere neutralizzati (p.es., con sodio bicarbonato 1N) prima dell'aggiunta di sodio ipoclorito.

La decontaminazione dei supporti riutilizzabili delle strisce di micropozzetti deve essere eseguita mediante trattamento con una soluzione di sodio ipoclorito allo 0,05% come descritto sopra.

#### PROCEDURA

**Materiali forniti:** Tutti i materiali elencati nel paragrafo "Reagenti", stazione di lavoro, pipette di trasferimento in plastica, supporto delle strisce di micropozzetti, banda di chiusura, schema di identificazione dei campioni e accessori.

**Materiali richiesti ma non forniti:** Incubatore a 35 – 37 °C, provette in plastica o vetro (12 x 75 mm) per la diluizione del campione, agitatore Vortex, lettore per micropozzetti EIA per la lettura di assorbanza di 450 nm o di 450/630 nm (facoltativo).

Si devono anche avere a disposizione le attrezzature di laboratorio necessarie per la preparazione, la conservazione e la manipolazione dei campioni clinici.

**Esecuzione del test:** Consultare i paragrafi "Precauzioni" e "Raccolta e preparazione dei campioni" prima di iniziare l'esecuzione del test. Prima dell'uso condizionare a temperatura ambiente i cartoncini, i reagenti, i campioni da dosare e tutti i componenti da utilizzare nel dosaggio.

Accertarsi che i reagenti si trovino nei rispettivi micropozzetti della stazione di lavoro. Rimuovere il tappo dal flacone del **Reagente 3** (lavaggio) e sostituirlo con il gruppo del beccuccio fornito con il kit. Dopo l'esecuzione dei test quotidiani, il gruppo del beccuccio sul flacone del reagente di lavaggio deve essere sostituito con il tappo originale del flacone.

Mescolare con delicatezza tutti i reagenti capovolgendoli prima dell'uso. Evitare la formazione di schiuma.

#### Preparazione dei campioni:

1. Pipettare 200 µL del **Reagente 1** (tampone del campione) in una provetta pulita da 12 x 75 mm utilizzando una micropipettrice calibrata o una pipetta da trasferimento (fino al secondo segno dalla punta della pipetta).

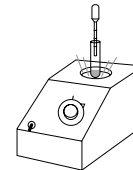


2. Mescolare il campione di feci il più accuratamente possibile.

- a. *Feci liquide, morbide o semi-solide*: Utilizzando una pipetta da trasferimento, trasferire 100  $\mu$ L (fino al primo segno) del campione nella provetta contenente il **Reagente 1**. Utilizzando la stessa pipetta da trasferimento mescolare aspirando ed espellendo il contenuto della provetta per 2 – 3 volte.



Mantenendo la pipetta da trasferimento nella provetta, agitare su Vortex la provetta a velocità moderata per 15 sec.



- b. *Feci solide*: Utilizzando una spatola di legno, trasferire circa 200 mg di campione di feci (5 – 6 mm di diametro, dimensioni di un pisello) nella provetta contenente il Reagente 1. Emulsionare il campione ed eliminare la spatola di legno in un contenitore per rifiuti biologici.

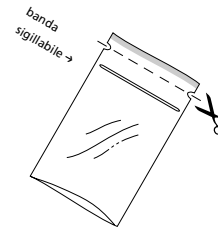


Agitare su Vortex la provetta a velocità moderata per 15 sec e porre nella provetta una pipetta da trasferimento.

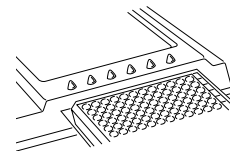
**Nota:** I campioni di feci, una volta diluiti nel **Reagente 1**, dovrebbero essere sottoposti a test al più presto.

#### Preparazione dei micropozzetti:

1. Aprire il sacchetto di carta laminata dei micropozzetti strappando o tagliando in corrispondenza delle tacche poste tra l'area termosigillata e la banda sigillabile, e rimuovere il contenuto.



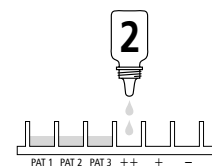
2. Rimuovere tutte le strisce di micropozzetti dal supporto utilizzando la fila di sporgenze sulla parte anteriore della stazione di lavoro.



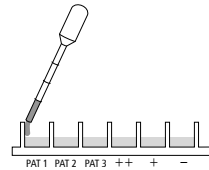
3. Prelevare il numero necessario di micropozzetti (uno per paziente più tre controlli per lotto) e posizionarli nel supporto delle strisce.
4. Riporre tutti i micropozzetti inutilizzati nel sacchetto di carta laminata, **richiudere** e riporre immediatamente in frigorifero.
5. Identificare la localizzazione di ogni pozzetto utilizzando lo schema di identificazione dei campioni.

#### Procedimento dell'analisi:

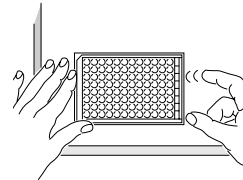
1. Aggiungere 2 gocce di **Reagente 2** (anticorpo coniugato) facendole cadere liberamente in tutti i micropozzetti.



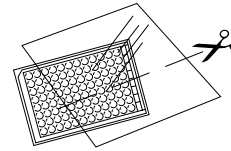
2. Utilizzando la pipetta da trasferimento o una micropipetta calibrata, prelevare 100  $\mu$ L di feci diluite (fino al primo segno) e far defluire il campione lentamente lungo la parete del rispettivo pozzetto prescelto. Eliminare la pipetta o la punta della micropipetta in un contenitore per rifiuti biologici.
3. Utilizzando una pipetta da trasferimento o la punta della micropipetta distinta per ogni controllo, prelevare 100  $\mu$ L di **Controllo ++**, **Controllo +** e **Controllo -** e far defluire il controllo lentamente lungo la parete dei rispettivi micropozzetti.



4. Mescolare i micropozzetti scuotendo leggermente la piastra su una superficie solida per 10 sec.

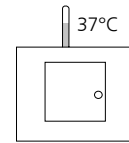


5. Tagliare la banda di chiusura alle dimensioni desiderate e farla aderire premendola fortemente sulla superficie dei micropozzetti.

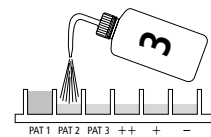


6. Incubare la piastra in un incubatore a 35 – 37 °C per 60 min.

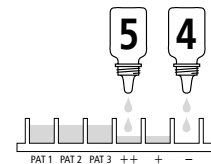
**Nota:** Verificare che la giusta temperatura sia mantenuta nella incubatrice per tutto il periodo di incubazione di 1 h.



7. Rimuovere con cautela la banda di chiusura e lavare i micropozzetti con il **Reagente 3** (lavaggio) nel modo seguente:
  - a. **ELIMINARE** il liquido capovolgendo (o aspirando) i micropozzetti in un contenitore per rifiuti biologici.
  - b. **TAMPONARE** la piastra capovolta su un fazzoletto di carta pulito posto su una superficie solida.
  - c. **RIEMPIRE** ogni pozzetto con il **Reagente 3** (lavaggio), eliminare il liquido (o aspirare) e tamponare la piastra capovolta su un fazzoletto di carta pulito.
  - d. **RIPETERE** il passaggio "c" altre quattro volte.
  - e. Dopo l'ultimo lavaggio, tamponare con decisione la piastra capovolta su un fazzoletto di carta pulito così da rimuovere la maggior quantità possibile di **Reagente 3** senza *dislocare le strisce*. Non consentire in ogni caso ai micropozzetti di asciugarsi.



8. Pulire la superficie inferiore di tutti i micropozzetti con una salvietta antifilacciamento.
9. Aggiungere 2 gocce di **Reagente 4** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) facendole cadere liberamente in tutti i micropozzetti, seguite da 2 gocce di **Reagente 5** (TMB) facendole cadere liberamente.



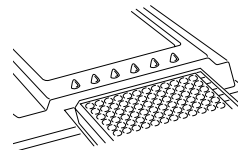
10. Mescolare il contenuto dei micropozzetti scuotendo leggermente la piastra per 10 sec e incubare a temperatura ambiente per 10 min.

#### Letture dei risultati:

1. Se vengono eseguite determinazioni ottiche, valutare il colore blu entro 5 min (dopo i 10 min del periodo di incubazione del passaggio 10). Se per la valutazione ottica si preferisce il colore giallo, aggiungere 2 gocce di **Reagente 6** (soluzione di arresto) in tutti i micropozzetti subito dopo i 10 min di incubazione del passaggio 10, scuotere la piastra con delicatezza per 10 sec e valutare il colore giallo entro 10 min dall'aggiunta del **Reagente 6**.

2. Se devono essere eseguite determinazioni al lettore per micropozzetti EIA, pulire la superficie inferiore di tutti i micropozzetti, azzerare il lettore contro aria (senza micropozzetti) e leggere l'assorbanza a 450 nm oppure a 450/630 nm entro 10 min dall'aggiunta del **Reagente 6**.

3. Terminata l'esecuzione dei test, le strisce usate possono essere rimosse dal supporto premendo quest'ultimo contro la fila di sporgenze poste nella parte anteriore della stazione di lavoro. I micropozzetti usati devono essere eliminati come descritto nel paragrafo "Raccolta e preparazione dei campioni".



**Controllo di qualità:** In ogni gruppo di campioni devono essere inclusi il **Controllo +** (basso positivo) e il **Controllo -** al fine di verificare le performance dei reagenti e l'adeguatezza delle procedure tecniche. Viene inoltre fornito un **Controllo ++** (alto positivo) come ausilio opzionale al fine di valutare due livelli di reazioni positive. Ciò assume particolare valore allorché i risultati vengano valutati otticamente, come ulteriore garanzia di correttezza metodologica.

Non riportare i risultati di pazienti se i controlli positivo o negativo non danno risultati appropriati come descritto nella tabella qui accanto.

	OTTICA	450 nm	450/630 nm
Controllo ++	Colore intenso (blu o giallo)	>1,500	>1,455
Controllo +	Colore debole (blu o giallo)	0,300 – 1,000	0,250 – 0,900
Controllo -	Incolore	<0,100	<0,070

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in osservanza delle norme locali, regionali e/o nazionali o dei requisiti di accreditazione e delle disposizioni standard di controllo di qualità del laboratorio utilizzato. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare i documenti NCCLS e le norme CLIA in merito.

#### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il test **Culturette** Toxin CD è stato studiato per consentire la valutazione ottica di un colore blu dopo il passaggio 10 ("Procedura") o, in alternativa, di un colore giallo dopo l'aggiunta del **Reagente 6**. Il test può essere inoltre valutato mediante un lettore per micropozzetti EIA.

##### 1. Valutazione ottica del colore blu:

Negativo = Incolore  
Positivo = Colore blu di **qualsiasi** intensità

##### 2. Valutazione ottica del colore giallo (dopo aggiunta del Reagente 6):

Negativo = Incolore  
Positivo = Colore giallo di **qualsiasi** intensità

##### 3. Lettore per micropozzetti EIA a singola lunghezza d'onda (450 nm):

Negativo =  $OD_{450} < 0,1$   
Non determinati =  $OD_{450} \geq 0,1$  ma  $< 0,15$   
Positivo =  $OD_{450} \geq 0,15$

##### 4. Lettore per micropozzetti EIA a doppia lunghezza d'onda (450/630 nm):

Negativo =  $OD_{450/630} < 0,070$   
Non determinati =  $OD_{450/630} \geq 0,070$  ma  $< 0,100$   
Positivo =  $OD_{450/630} \geq 0,100$

Quando si usa un lettore di micropozzetto EIA per interpretare le reazioni, i risultati non determinati devono essere ripetuti. Se i risultati sono ancora non determinati, deve essere prelevato dal paziente e sottoposto a test un campione fresco. Quando si leggono ad occhio, le reazioni dovrebbero essere classificate positive se si sviluppa colore di qualsiasi intensità. Le reazioni incolore sono classificate negative.

**Nota:** Reazioni fortemente positive possono determinare la comparsa di un precipitato bruno entro 5 – 10 min dall'aggiunta del **Reagente 6**, che tuttavia non interferisce con l'interpretazione dei risultati.

#### LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il test **Culturette** Toxin CD rileva la presenza della tossina A in campioni di feci umani. Poiché non è stata dimostrata una chiara correlazione tra la quantità di tossina A e la presenza o la gravità della malattia, i risultati del test devono essere interpretati da un medico assieme ad altri riscontri clinici e di laboratorio.

È stato dimostrato che alcuni isolati di *Clostridium sordellii* producono una tossina emorragica (HT) con caratteristiche biologiche, fisicochimiche e immunochimiche simili a quelle della tossina A. La HT può presentare nei test una reazione crociata con la tossina A.<sup>4</sup> I ceppi HT di *C. sordellii* non sono stati riscontrati in pazienti con diarrea e colite associate a somministrazione di antibiotici. I neonati e i pazienti con fibrosi cistica possono presentare la tossina di *C. difficile* nelle feci, senza alcun significato clinico.<sup>11,12</sup>

Come con test di altre case, la preparazione dei campioni è importante per il mantenimento dei titoli della tossina A. Se il test viene rimandato, si raccomanda il congelamento a -70 °C dei campioni (vedere "Raccolta e preparazione dei campioni").

**VALORI PREVISTI**

*Clostridium difficile* è un patogeno opportunista che estrinseca i propri effetti tossici allorché il tratto intestinale è stato in qualche modo compromesso, come p.es. in seguito a trattamento con antibiotici. Pertanto sono maggiormente colpiti i pazienti sottoposti recentemente a terapia antibiotica o quelli in terapia cronica. Fino all'1% dei soggetti adulti sani può presentare una positività ai test per la presenza di tossine nelle feci in coltura.<sup>13</sup> La frequenza delle infezioni nosocomiali può variare in rapporto all'istituzione, alla sezione, alle procedure di gestione e alla popolazione dei pazienti.<sup>13,14</sup> Il test **Culturette** Toxin CD ha fornito risultati positivi in una percentuale variabile dal 3,8% al 18,5% dei pazienti sintomatici.<sup>15</sup> Possono essere ottenute frequenze di positività al disopra o al disotto di questi valori.

**CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE**

La performance del test **Culturette** Toxin CD è stata valutata in test eseguiti presso quattro grandi centri medici indipendenti tra di loro, situati in aree geografiche diverse degli Stati Uniti. Nel corso della valutazione è stato utilizzato un totale di 905 campioni di feci fresche prelevate da pazienti con sintomi clinici di sospette malattie associate a *C. difficile*, inviati specificamente al laboratorio per la determinazione della citotossina B di *C. difficile*. La frequenza media di *C. difficile* nei campioni dei pazienti sottoposti a test è risultata del 13%, con valori estremi dal 4% al 20%. I risultati del test per la citotossina B sono stati utilizzati come primo metodo di riferimento. I campioni discordanti sono stati nuovamente determinati in duplicato e, se ancora discordanti, il risultato del test **Culturette** Toxin CD è stato paragonato con un risultato di consenso. Il risultato di consenso è stato ottenuto riassumendo la diagnosi clinica, i risultati della coltura tossigena, se disponibili, le informazioni su altri test. I risultati dello studio sono illustrati nella Tabella 1, in cui il test **Culturette** Toxin CD viene letto mediante un lettore per micropozzetti EIA, e nelle Tabelle 2 e 3 in cui viene valutato otticamente rispettivamente con il colore blu e giallo. Il test **Culturette** Toxin CD ha fornito livelli di performance dell'87 – 92% per quanto riguarda la sensibilità e del 95 – 98% per quanto riguarda la specificità, in rapporto al metodo di lettura e al riferimento adottati. I risultati non determinanti non sono inclusi nei calcoli per la sensibilità e specificità.

**Tabella 1**

**Paragone dei risultati del test Culturette Toxin CD utilizzando un lettore per micropozzetti EIA, rispetto ai risultati del test di citotossicità e dei risultati del test di citotossicità con risoluzione dei discordanti.**

Culturette Toxin CD	Risultati del test di citotossicità		Citotossicità con risoluzione dei discordanti	
	Positivi	Negativi	Positivi	Negativi
Positivi	99	24	110	12
Negativi	17	732	9	760
Non determinat	5	19	2	3

*Sensibilità	85 %	<b>92 %</b>
*Specificità	97 %	<b>98 %</b>
Valore predittivo positivo	80 %	<b>89 %</b>
Valore predittivo negativo	98 %	<b>99 %</b>
Non determinati	3 %	<b>&lt; 1 %</b>
Accuratezza totale	93 %	<b>97 %</b>
**Numero totale	896	<b>896</b>

**Tabella 2**

**Paragone dei risultati del test Culturette Toxin CD utilizzando una valutazione ottica con il colore blu, rispetto ai risultati del test di citotossicità**

Culturette Toxin CD	Risultati del test di citotossicità	
	Positivi	Negativi
Positivi	103	21
Negativi	15	727

*Sensibilità	87 %
*Specificità	97 %
Valore predittivo positivo	83 %
Valore predittivo negativo	98 %
Accuratezza totale	95 %
***Numero totale	871

**Tabella 3**  
**Paragone dei risultati del test Culturette Toxin CD utilizzando una valutazione ottica con il colore giallo, rispetto ai risultati del test di citotossicità**

Culturette Toxin CD	Risultati del test di citotossicità	
	Positivi	Negativi
Positivi	104	37
Negativi	14	710

*Sensibilità	88 %
*Specificità	95 %
Valore predittivo positivo	74 %
Valore predittivo negativo	98 %
Accuratezza totale	93 %
***Numero totale	871

\*Le medie ponderate basate sul numero di campioni positivi o negativi sottoposti a test in ogni prova sono in rapporto al numero totale di campioni sottoposti a test.

\*\*Per 9 campioni non sono state registrate le letture spettrofotometriche.

\*\*\*Per 34 campioni non sono state registrate le determinazioni ottiche.

La riproducibilità del test è stata determinata utilizzando tre campioni di controllo contenenti una quantità elevata, bassa e rispettivamente nulla di tossina A. La concordanza delle letture a singola e a doppia lunghezza d'onda per i controlli positivi e negativi è risultata del 100%. Nella tabella seguente viene illustrata la precisione intra- e intersaggio in campioni di feci liquide.

**Tabella 4: Precisione del test Culturette Toxin CD**

Campione	Media singola	Media doppia	% CV Intrasaggio singola	% CV Intersaggio singola	% CV Intrasaggio doppia	% CV Intersaggio doppia
Controllo -	0,0440	0,0075	4,34	4,77	10,6	18,67
Controllo +	0,6692	0,6285	7,6	10,55	8,06	11,06
Controllo ++	2,38	2,32	9,23	13,92	9,18	13,95

Nella Tabella 5 viene illustrata una classificazione della consistenza dei campioni di feci riscontrata in pazienti con sintomi clinici nel corso dell'indagine. L'informazione viene presentata dal punto di vista del totale dei campioni e soltanto per i campioni positivi.

**Tabella 5: Consistenza dei campioni di feci**

	Popolazione totale N/%	Campioni positivi N/%
Liquida	100 (11%)	6 (5%)
Morbida	371 (41%)	67 (55%)
Semi-solida	263 (29%)	35 (29%)
Solida	150 (17%)	11 (9%)
Non classificata	21 (2%)	3 (2%)

Microrganismo	Assorbanza a 450 nm	
	In campioni di feci negativi	In campioni di feci positivi
<i>Aeromonas hydrophilia</i> ATCC 7966	0,054 (-)	0,980 (+)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0,053 (-)	0,951 (+)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 33608	0,062 (-)	0,993 (+)
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	0,054 (-)	0,902 (+)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,053 (-)	0,920 (+)
<i>Clostridium botulinum</i> ATCC 17786	0,056 (-)	0,966 (+)
<i>Clostridium butyricum</i> ATCC 8260	0,057 (-)	0,904 (+)
<i>Clostridium histolyticum</i> ATCC 19401	0,055 (-)	0,959 (+)
<i>Clostridium innocuum</i> ATCC 14501	0,054 (-)	0,990 (+)
<i>Clostridium novyi</i> ATCC 19402	0,054 (-)	0,832 (+)
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	0,055 (-)	0,984 (+)
<i>Clostridium septicum</i> ATCC 12464	0,055 (-)	1,006 (+)
<i>Clostridium sordellii</i> VPI 9048	0,280 (+)	1,124 (+)
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 3584	0,057 (-)	0,858 (+)
<i>Clostridium subterminale</i> ATCC 29748	0,058 (-)	0,891 (+)
<i>Clostridium tetani</i> ATCC 19406	0,057 (-)	0,839 (+)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,053 (-)	0,903 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	0,058 (-)	0,884 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43889	0,057 (-)	0,297 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43894	0,056 (-)	0,312 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43895	0,058 (-)	0,281 (+)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	0,061 (-)	0,808 (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14207	0,056 (-)	0,835 (+)
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	0,051 (-)	0,838 (+)
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 29027	0,054 (-)	0,942 (+)
<i>Shigella flexnerii</i> ATCC 12661	0,053 (-)	0,941 (+)
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	0,056 (-)	0,969 (+)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598	0,051 (-)	1,069 (+)
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 11623	0,052 (-)	0,944 (+)
<i>Vibrio parahemolyticus</i> ATCC 17802	0,053 (-)	0,799 (+)
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	0,056 (-)	1,016 (+)

**Reazioni crociate:** Il test **Culturette** Toxin CD reagisce con tutti i ceppi produttori di tossine di riferimento di *C. difficile*.<sup>15</sup> Il test non ha presentato reazione con il ceppo non produttore di tossine VPI 11186. La reazione crociata è risultata negativa con i batteri elencati in Tabella 6. Il test è stato eseguito con campioni di feci positivi e negativi per la tossina A di *C. difficile* e aggiungendo i vari microrganismi alla concentrazione finale di 10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup> CFU/mL di feci. Come previsto, l'unico microrganismo che ha presentato reazione crociata nel corso del test è risultato un isolato altamente tossigeno di *Clostridium sordellii* VPI 9048. Questo isolato produce quantità elevate di tossine emorragiche e letali che sono risultate simili dal punto di vista immunologico e biologico alle tossine A e B di *C. difficile*. Lo *Staphylococcus aureus* Cowan ceppo ATCC 12598, che produce proteina A, non ha presentato reazione crociata. Inoltre *Escherichia coli* ATCC 43889, 43894 e 43895 che producono tossine simili a Shiga non hanno presentato alcuna reazione crociata.

#### DISPONIBILITÀ

##### N° di cat. Descrizione

254004 **Culturette** Toxin CD, kit per 96 test

264001 **Culturette CDT** Test al lattice per la rilevazione rapida del *C. difficile*, kit DA 25 test.

273310 Ponte per pipetta, scatola da 1000.

**BIBLIOGRAFIA:** Vedere "References" nel testo inglese.



# BD Culturette Toxin CD

Español

**USO PREVISTO**

La prueba **Culturette Toxin CD** es un inmunoensayo enzimático rápido (70 min) para la detección de la toxina A (enterotoxina) del *Clostridium difficile* en las deposiciones humanas. Este ensayo ha sido concebido para ayudar en el diagnóstico de la enfermedad asociada al *C. difficile*.

**RESUMEN Y EXPLICACION**

El *C. difficile* es un importante agente causal de la diarrea asociada al uso de antibióticos, que en su forma más seria puede traducirse en el síndrome clínico de la colitis pseudomembranosa y en una considerable mortalidad. Aunque el *C. difficile* puede formar parte de la flora intestinal bacteriana normal, puede convertirse en agente patógeno oportunista tras someter al paciente a un tratamiento con antibióticos y la subsiguiente alteración de la flora intestinal normal. Si se dan las condiciones adecuadas, las cepas de *C. difficile* que producen toxinas dan lugar a dos toxinas: la toxina A, enterotoxina que daña los tejidos, y la toxina B, citotoxina *in vitro*.<sup>1</sup> En estos momentos, la bibliografía señala que tanto la toxina A como la toxina B se producen al mismo tiempo.<sup>2</sup> Se cree que los síntomas clínicos asociados a esta enfermedad se deben fundamentalmente a la toxina A, y hasta la fecha no existen pruebas convincentes de que la toxina B tenga actividad biológica de importancia en la enfermedad cuando ésta se produce de modo natural.<sup>3</sup>

Las ayudas al diagnóstico clínico más comunes para la colitis provocada por el *C. difficile* y asociada a los antibióticos han sido los ensayos de citotoxicidad con cultivo de células y de aglutinación de látex.<sup>4</sup> El primero de estos ensayos detecta la toxina B mediante el efecto citopático en un cultivo de células. Aunque es muy sensible, este ensayo requiere por lo menos dos días para su realización. La aglutinación de látex detecta los antígenos del *C. difficile* en vez de las toxinas específicas, pero se considera un ensayo rápido y útil para definir el papel etiológico del *C. difficile* en pacientes con diarrea.<sup>5</sup> Ninguno de estos ensayos detecta la toxina A que, según se cree, es la causa de la diarrea.

**PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO**

La prueba **Culturette Toxin CD** utiliza un anticuerpo de captura de la anti-toxina A en micropocillos recubiertos. En estos micropocillos se colocan la muestra tomada del paciente y el anticuerpo detector de la antitoxina A conjugado con enzimas, y todo ello se incuba durante una hora a una temperatura de 35 a 37 °C. Si la toxina A se encuentra presente, se desarrolla un complejo reactivo de anti-toxina y enzimas. Tras un lavado para eliminar el conjugado libre, se añaden un sustrato y un cromógeno, y se incuban durante 10 min a temperatura ambiente. Aparece una coloración si hay presencia de enzimas ligadas. Las reacciones se leen a continuación en forma visual, o espectrofotométricamente si se desea.

**REACTIVOS**Equipo **Culturette Toxin CD**:

<b>Reactivo 1</b>	(20,0 mL)	Tampón para muestras, estabilizador de proteína, con timerosal (conservante) al 0,02%.
<b>Reactivo 2</b>	(10,0 mL)	Reactivo de conjugado, anticuerpo policlonal (de conejo) específico para la toxina A del <i>C. difficile</i> conjugado con peroxidasa de rábano en estabilizador tamponado de proteína, con timerosal (conservante) al 0,01%.
<b>Reactivo 3</b>	(225,0 mL)	Reactivo de lavado, detergente no reactivo en agua desionizada.
<b>Reactivo 4</b>	(10,0 mL)	Reactivo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , solución tamponada con peróxido de hidrógeno.
<b>Reactivo 5</b>	(10,0 mL)	Reactivo TMB, solución con tetrametilo de bencidina.
<b>Reactivo 6</b>	(10,0 mL)	Reactivo de parado, 1,0 N de ácido sulfúrico. <i>Precaución:</i> evite el contacto con la piel. Si se produce contacto, lave inmediatamente con agua.
<b>Control -</b>	(1,9 mL)	Control negativo, contiene estabilizadores de proteína y timerosal (conservante) al 0,02%.
<b>Control +</b>	(1,9 mL)	Control positivo bajo, contiene toxina A inactivada del <i>C. difficile</i> , estabilizadores de proteína y timerosal (conservante) al 0,01%.
<b>Control ++</b>	(1,9 mL)	Control positivo alto, contiene toxina A inactivada del <i>C. difficile</i> , estabilizadores de proteína y timerosal (conservante) al 0,01%.

Tiras de micropocillos recubiertos con anticuerpos policlonales de conejo, específicos para la toxina A del *C. difficile*.

**Precauciones:** Para uso diagnóstico *in vitro*.

**Reactivos:** No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad. Después de sacarlos del refrigerador, deje que alcancen la temperatura ambiente antes de usarlos. NO MEZCLE los reactivos de equipos que tengan números de lote diferentes.

Evite que los **Reactivos 4 y 5** queden expuestos a una luz fuerte durante mucho tiempo.

Para asegurarse de que las gotas sean del tamaño adecuado, mantenga los frascos dispensadores de reactivo en posición vertical encima del micropocillo, y deje caer las gotas de una en una.

Evite que la piel entre en contacto con el **Reactivo 6** (1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Si se produce contacto, lave inmediatamente con agua.

**Controles:** No utilice el equipo si los controles positivo y negativo no producen los resultados apropiados. Los controles positivos están fabricados con antígeno inactivado de toxina A. No obstante, deben manipularse como material potencialmente biopeligroso.

**Pipetas de transferencia:** Son de un solo uso; no vuelva a utilizarlos.

**Almacenamiento de los reactivos:** Al recibirlos, refrigere los reactivos a una temperatura de entre 2 y 8 °C. NO CONGELAR. Los reactivos deben taparse y refrigerarse nuevamente cuando no vayan a usarse, cerciorándose de no confundir los tapones codificados por colores.

**Reactivo 3** (Lavado) puede almacenarse a temperatura ambiente (con la tapa original) o refrigerarse a una temperatura de entre 2 y 8 °C. **Después de sacarlos del refrigerador, deje que alcancen la temperatura ambiente durante 90 min.**

**Micropocillos:** No vuelva a utilizarlos. Efectúe el lavado de los micropocillos siguiendo con exactitud el procedimiento que se describe en "Realización de la prueba". Un lavado inadecuado puede traducirse en la lectura de unos valores de fondo elevados, o en la aparición de color de forma fortuita en muestras negativas para la toxina A.

Los micropocillos se presentan envueltos en un envase de papel de aluminio que puede volver a sellarse y que ha sido concebido para proteger las tiras de la humedad. La envoltura deberá abrirse según se describe en "Procedimiento del ensayo". Conserve los micropocillos dentro del envase de aluminio hasta que éste alcance la temperatura ambiente. Vuelva a colocar inmediatamente en el envase de papel de aluminio, que contiene desecante, todos los micropocillos que no hayan sido utilizados. Selle de nuevo y vuelva a refrigerarlo.

#### RECOGIDA Y MANIPULACION DE LAS MUESTRAS

Recoja las muestras de deposiciones en un contenedor limpio y con cierre hermético sin conservante. Las pruebas de las muestras deberán realizarse lo más pronto posible una vez recibidas en el laboratorio; no obstante, pueden almacenarse durante un máximo de 48 h a una temperatura de entre 2 y 8 °C. Si las muestras van a ser sometidas a las pruebas después de las 48 h, deberán congelarse a -70 °C inmediatamente después de ser recibidas en el laboratorio. Aunque la mayoría de las muestras positivas presentarán una reducción escasa o nula de toxina A después de un ciclo de congelación y descongelación,<sup>6</sup> *es preferible contar con muestras frescas.*

Deje que las muestras de deposiciones alcancen la temperatura ambiente y mézclelas cuanto sea posible antes de utilizarlas.

**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"<sup>7-10</sup> y las directrices del centro.

De acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, deberán usarse guantes desechables durante todo el ensayo y lavarse bien las manos al finalizar.

Deseche todos los materiales empleados en la realización de la prueba colocándolos en un autoclave durante 60 min a 121 °C o tratándolos con una solución al 0,05% de hipoclorito sódico (dilución al 1:100 de lejía común) durante 30 min. *No coloque en el autoclave material que contenga hipoclorito sódico.* **ADVERTENCIA:** Los residuos líquidos que contengan ácido sulfúrico deberán ser neutralizados (por ejemplo, con 1 N de bicarbonato sódico) antes de añadir el hipoclorito sódico.

Entre un ensayo y otro, la descontaminación del soporte reutilizable para las tiras de micropocillos puede conseguirse con un tratamiento con solución al 0,05% de hipoclorito sódico, según se ha descrito anteriormente.

#### PROCEDIMIENTO

**Materiales suministrados:** Todos los materiales que se enumeran bajo "Reactivos", puesto de trabajo, pipetas de transferencia de plástico, soporte para tiras de micropocillos, sellador de tiras, plantilla de identificación de muestras y accesorios.

**Materiales necesarios pero no suministrados:** Una incubadora para una temperatura de 35 a 37 °C, tubos de ensayo de plástico o vidrio (12 x 75 mm) para la dilución de las muestras, agitador de torbellino, lector de micropocillos de inmunoensayo enzimático capaz de leer la absorbencia a 450 nm o 450/630 nm (opcional).

También se precisan el equipo y material de laboratorio necesarios para la preparación, almacenamiento y manipulación de las muestras clínicas.

**Realización de la prueba:** Vuelva a leer "Precauciones" y "Recogida y manipulación de las muestras" antes de efectuar las pruebas. La zona en que se van a realizar las pruebas, los reactivos, las muestras y los componentes de la prueba deben encontrarse a temperatura ambiente en el momento de usarse.

Compruebe que los reactivos están en los pocillos correspondientes del puesto de trabajo. Retire la tapa de la botella del **Reactivo 3** (Lavado) y sustitúyala por la boquilla que se incluye en el equipo. Una vez finalizadas las pruebas del día, deberá colocar de nuevo la tapa en lugar de la boquilla.

Mézcle suavemente por inversión todos los reactivos antes de utilizarlos. Evite la formación de espuma.

#### Preparación de las muestras:

1. Ponga 200 µL del **Reactivo 1** (Tampón para muestras) en un tubo limpio de 12 x 75 mm utilizando una micropipeta aforada o bien una pipeta de transferencia (hasta la segunda marca empezando por la boca de la pipeta).

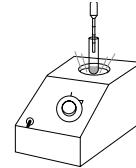


2. Mezcle la muestra de deposiciones cuanto sea posible.

- a. *Deposiciones líquidas, sueltas o semisólidas:* Utilizando una pipeta de transferencia, transfiera 100 µL (hasta la primera marca) de la muestra al tubo que contiene el **Reactivo 1**. Con la misma pipeta de transferencia, mezcle soltando y recuperando el contenido del tubo 2 ó 3 veces.



Manteniendo la pipeta de transferencia en el tubo, haga girar el tubo a una velocidad moderada durante 15 seg.



- b. *Deposiciones sólidas:* Utilizando una espátula de madera, transfiera aproximadamente 200 mg (diámetro de 5 – 6 mm, tamaño "guisante") de la muestra de deposiciones al tubo que contiene el **Reactivo 1**. Emulsione la muestra y deposite la espátula de madera en un recipiente para productos biopeligrosos.

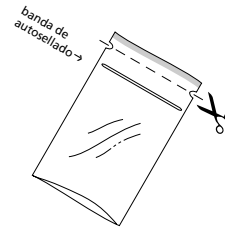
Haga girar el tubo a una velocidad moderada durante 15 seg y coloque en el mismo una pipeta de transferencia.



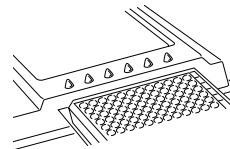
**Nota:** Las muestras de deposición, una vez diluidas en el **Reactivo 1**, deben ser sometidas al ensayo lo más pronto posible.

**Preparación de los micropocillos:**

1. Abra el envase de papel de aluminio que contiene los micropocillos rasgando o cortando por las marcas, entre la zona de termosellado y la banda de autosellado, y extraiga el contenido.



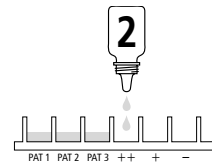
2. Retire todas las tiras de micropocillos de su soporte utilizando la fila de botones de la parte frontal del puesto de trabajo.



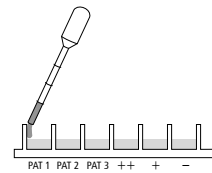
3. Separe el número de micropocillos necesario (uno por cada paciente, más tres de control por cada lote), y colóquelos en el soporte de tiras.
4. Vuelva a colocar todos los micropocillos no utilizados en el envase de papel de aluminio, **vuelva a sellarlo** y colóquelo inmediatamente en el lugar de refrigeración.
5. Identifique la ubicación de cada pocillo utilizando la Plantilla de Identificación de Muestras incluida en el puesto de trabajo.

**Procedimiento del ensayo:**

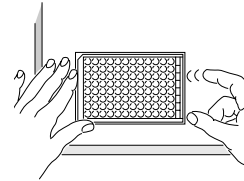
1. Deje caer, sin forzar el frasco, 2 gotas del **Reactivo 2** (Conjugado) en todos los micropocillos.



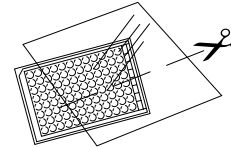
2. Utilizando la pipeta de transferencia o una micropipeta calibrada, extraiga un máximo de 100 µL de la deposición diluida (hasta la primera marca) y deje que la muestra se deslice lentamente por la pared del micropocillo correspondiente. Deposite la pipeta de transferencia o la punta de la micropipeta en un recipiente para productos biopeligrosos.
3. Utilizando una pipeta de transferencia o una punta de micropipeta distinta para cada uno de los controles, extraiga un máximo de 100 µL de **Control ++**, **Control +** y **Control -**, y deje que éste se deslice lentamente por la pared de los micropocillos correspondientes.



4. Mezcle el contenido de los micropocillos golpeando la plancha ligeramente sobre una superficie estable durante 10 seg.

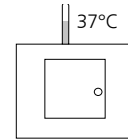


5. Recorte el sellador para tiras de micropocillos hasta conseguir el tamaño adecuado y tape bien los micropocillos.



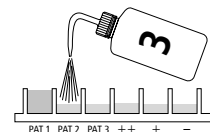
6. Incube la plancha en una incubadora a una temperatura de entre 35 y 37 °C durante 60 min.

**Nota:** Asegúrese que la temperatura del incubador se mantenga durante todo el período de incubación de 1 h.

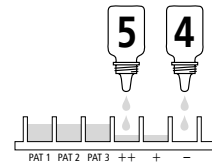


7. Retire con cuidado el sellador de la tira de micropocillos y lávelos con el **Reactivo 3** (Lavado) de la manera siguiente:

- a. DECANTE los micropocillos por inversión (o aspiración) en un recipiente para productos biopeligrosos.
- b. COLOQUE con un golpe seco la plancha invertida sobre servilletas de papel limpias extendidas en una superficie sólida.
- c. LLENE todos los micropocillos con el **Reactivo 3** (Lavado), vacíelos (o aspírelos), y coloque con un golpe seco la plancha invertida sobre servilletas de papel limpias.
- d. REPITA el paso "c" 4 veces más.
- e. Después del último lavado, coloque con un golpe seco las planchas invertidas sobre servilletas de papel limpias, de forma que el impulso sea suficiente para eliminar tanto **Reactivo 3** sobrante como sea posible *sin descolocar las tiras*. No permita en ningún momento que los micropocillos se sequen por completo.



8. Limpie el fondo de todos los micropocillos con un paño que no desprenda pelusa.
9. Deje caer, sin forzar el frasco, 2 gotas del **Reactivo 4** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en cada micropocillo, y después añada otras 2 gotas, sin forzar el frasco, del **Reactivo 5** (TMB).



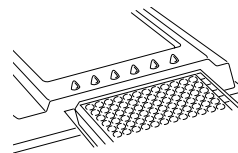
10. Mezcle el contenido de los micropocillos golpeando la plancha ligeramente durante 10 seg, e incúbelos a temperatura ambiente durante 10 min.

#### Lectura de los resultados:

1. Si va a realizarse una determinación visual, lea el color azul antes de transcurridos 5 min (tras el período de 10 min de incubación que se indica en el paso 10). Si se prefiere el color amarillo para la lectura visual, añada

en cada micropocillo dos gotas del **Reactivo 6** (Parado) inmediatamente después del período de 10 min de incubación señalado en el paso 10, dé unos golpes ligeros durante 10 seg y proceda a la lectura del color amarillo antes de transcurridos 10 min de la adición del **Reactivo 6**.

- Si las determinaciones de los micropocillos de inmunoensayo enzimático van a realizarse mediante un lector, limpie la base de todos los micropocillos, ponga a cero el lector de inmunoensayo enzimático vacío (sin los micropocillos), y efectúe la lectura de la absorbencia a 450 nm o 450/630 nm antes de transcurridos 10 minutos de la adición del **Reactivo 6**.
- Una vez concluidas las pruebas, pueden retirarse del soporte aquellas tiras de micropocillos que se hayan utilizado, presionando el soporte contra la fila de botones en la parte frontal del puesto de trabajo. Los micropocillos usados deben desecharse de la forma descrita en "Recogida y manipulación de las muestras".



**Control de calidad:** El **Control +** (Positivo bajo) y el **Control -** deben utilizarse en todos los lotes de muestras para verificar el rendimiento de los reactivos y para comprobar que el procedimiento se ha realizado correctamente. También se incluye un **Control ++** (Positivo alto) como medio optativo para verificar dos niveles de reacciones positivas. Este control resulta especialmente útil cuando los resultados se leen visualmente, como garantía adicional de que el procedimiento ha sido correcto.

No se deben reportar los resultados de las muestras sometidas a la prueba si los controles positivo y negativo no producen los resultados apropiados según la tabla siguiente.

	VISUAL	450 nm	450/630 nm
Control ++	Color intenso (azul o amarillo)	>1,500	>1,455
Control +	Color moderado (azul o amarillo)	0,300 – 1,000	0,250 – 0,900
Control -	Incoloro	<0,100	<0,070

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 normas NCCLS y CLIA como guía para las prácticas de control de calidad adecuadas.

#### INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La prueba **Culturette** Toxin CD ha sido diseñada de modo que sea posible la lectura visual del color azul después del paso 10 ("Procedimiento del ensayo") o bien del color amarillo después de añadir el **Reactivo 6**. Los resultados de la prueba también pueden leerse con un lector de micropocillos de inmunoensayo enzimático.

##### 1. Lectura visual del color azul:

Negativo = Incoloro  
Positivo = Color azul de **cualquier** intensidad

##### 2. Lectura visual del color amarillo (con adición del **Reactivo 6**):

Negativo = Incoloro  
Positivo = Color amarillo de **cualquier** intensidad

##### 3. Lector de micropocillos de inmunoensayo enzimático, longitud de onda única (450 nm):

Negativo =  $OD_{450} < 0,1$   
Indeterminado =  $OD_{450} \geq 0,1$  pero  $< 0,15$   
Positivo =  $OD_{450} \geq 0,15$

##### 4. Lector de micropocillos de inmunoensayo enzimático, longitud de onda doble (450/630 nm):

Negativo =  $OD_{450/630} < 0,070$   
Indeterminado =  $OD_{450/630} \geq 0,070$  pero  $< 0,100$   
Positivo =  $OD_{450/630} \geq 0,100$

Cuando se utilice un lector de micropocillos de inmunoensayo enzimático, si hay resultados indeterminados, deberá repetirse la prueba. Si vuelven a ser indeterminados, deberá tomarse una nueva muestra del paciente y repetir la prueba. Si las lecturas se hacen en forma visual, las pruebas que muestren color de cualquier intensidad deben considerarse positivas. Las reacciones incoloras se consideran negativas.

**Nota:** Las reacciones positivas extremadamente fuertes pueden dar lugar a un precipitado de color marrón oscuro a los 5 - 10 min de añadir el **Reactivo 6**, lo cual no afecta la interpretación de los resultados.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La prueba **Culturette** Toxin CD detecta la presencia de toxina A en las deposiciones humanas. Dado que no se ha demostrado que los niveles de toxina A estén en correlación determinante con la existencia o la gravedad de la enfermedad, los resultados del ensayo deberán ser interpretados por el médico teniendo en cuenta otros datos clínicos y de laboratorio.

Se ha demostrado que algunos aislados de *Clostridium sordellii* producen una toxina hemorrágica (TH), cuyas propiedades biológicas, fisicoquímicas e inmunológicas son similares a las de la toxina A. La TH puede mostrar reacciones cruzadas en las pruebas de la toxina A.<sup>4</sup> No se han detectado cepas de *C. sordellii* con TH en pacientes

con diarrea y colitis asociadas al empleo de antibióticos. Es posible que la toxina del *C. difficile* esté presente en las deposiciones de niños y de enfermos de fibrosis quística, sin que ello tenga ningún significado clínico.<sup>11,12</sup>

Como en cualquier otra prueba, la manipulación de las muestras es importante para el mantenimiento de los títulos de toxina A. Si se va a retrasar la prueba, se recomienda congelar las muestras a -70 °C (vea "Recogida y manipulación de las muestras").

#### VALORES ESPERADOS

El *Clostridium difficile* es un agente patógeno oportunista que ejerce sus efectos toxicogénicos cuando el tracto intestinal se ha visto afectado de algún modo, por ejemplo, por una terapia con antibióticos. Por lo tanto, las infecciones suelen producirse con más frecuencia en pacientes que se hayan sometido recientemente a una terapia con antibióticos o que se encuentren en una situación de tratamiento crónico. Hasta un 1% de adultos sanos pueden tener resultados positivos en la prueba de cultivo para detección de la toxina en las deposiciones.<sup>13</sup> La tasa de infecciones nosocomiales puede variar según la institución, la sección y las prácticas de limpieza, y también la población de pacientes.<sup>13,14</sup> La prueba **Culturette** Toxin CD ha señalado tasas positivas de entre el 3,8% y el 18,5% en pacientes sintomáticos.<sup>15</sup> Pueden observarse tasas positivas por encima o por debajo de estos valores.

#### CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento de la prueba **Culturette** Toxin CD se determinó mediante evaluaciones prospectivas realizadas en cuatro importantes centros médicos independientes ubicados en distintas zonas geográficas de los Estados Unidos. Para esta evaluación se utilizó un total de 905 muestras de deposiciones frescas tomadas de pacientes sintomáticos en los que se sospechaba la enfermedad asociada al *C. difficile*, y que fueron recogidas específicamente para la prueba de la citotoxina B del *C. difficile*. La prevalencia media del *C. difficile* en las muestras sometidas a la prueba fue del 13%, siendo los valores extremos del 4% y el 20%. Se emplearon los resultados de la prueba de la citotoxina B como método de referencia fundamental. Las muestras discordes fueron ensayadas nuevamente por duplicado y, si aún no se lograban datos concluyentes, se comparaba el resultado de la prueba **Culturette** Toxin CD con el resultado general. Este resultado se estableció revisando el diagnóstico clínico, el resultado del cultivo toxicogénico y otras informaciones de las pruebas si existían. Los resultados de este estudio se presentan en la tabla 1, donde la prueba **Culturette** Toxin CD se ha interpretado mediante un lector de micropocillos de inmunoensayo enzimático, y también en las tablas 2 y 3, en los que se ha interpretado visualmente por los colores azul y amarillo, respectivamente. La prueba **Culturette** Toxin CD presentó niveles de rendimiento de una sensibilidad del 87 al 92% y una especificidad del 95 al 98%, dependiendo del método de lectura y de la referencia empleada. No se incluyen los resultados indeterminados en los cálculos de sensibilidad y especificidad.

Tabla 1

Comparación de los resultados de la prueba **Culturette** Toxin CD empleando un lector de micropocillos de inmunoensayo enzimático y los resultados de la prueba de la citotoxina con resolución de resultados discordes

Culturette Toxin CD	Resultados de la citotoxina		Citotoxina y resolución de resultados discordes	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Positivos	99	24	110	12
Negativos	17	732	9	760
Indeterminados	5	19	2	3

*Sensibilidad	85 %	<b>92 %</b>
*Especificidad	97 %	<b>98 %</b>
Valor predictivo positivo	80 %	<b>89 %</b>
Valor predictivo negativo	98 %	<b>99 %</b>
Indeterminados	3 %	<b>&lt;1 %</b>
Precisión global	93 %	<b>97 %</b>
**Cifra total	896	<b>896</b>

Tabla 2

Comparación de los resultados de la prueba **Culturette** Toxin CD empleando un punto visual final de color azul y los resultados de la prueba de la citotoxina

Culturette Toxin CD	Resultados de la citotoxina	
	Positivos	Negativos
Positivos	103	21
Negativos	15	727

*Sensibilidad	87 %
*Especificidad	97 %
Valor predictivo positivo	83 %
Valor predictivo negativo	98 %
Precisión global	95 %
***Cifra total	871

**Tabla 3**  
**Comparación de los resultados de la prueba Culturette Toxin CD empleando un punto visual final de color amarillo y los resultados de la prueba de la citotoxina**

Culturette Toxin CD	Resultados de la citotoxina	
	Positivos	Negativos
Positivos	104	37
Negativos	14	710

*Sensibilidad	88 %
*Especificidad	95 %
Valor predictivo positivo	74 %
Valor predictivo negativo	98 %
Precisión global	93 %
***Cifra total	871

\* Medias ponderadas basadas en el número de muestras positivas o negativas sometidas a la prueba en cada centro, en relación con el número total de muestras probadas.

\*\* No se registraron las lecturas espectrofotométricas correspondientes a 9 muestras.

\*\*\*No se registraron los resultados visuales finales correspondientes a 34 muestras.

Se comprobó la posibilidad de reproducir el ensayo utilizando tres muestras de control que contenían, respectivamente, cantidades elevadas, bajas y nulas de la toxina A. La concordancia de las lecturas con longitud de onda única y doble para resultados positivos y negativos fue del 100%. La precisión intraensayo y entreensayos con muestras de deposiciones líquidas se presenta en la tabla siguiente.

**Tabla 4: Precisión del ensayo Culturette Toxin CD**

Muestra	Media Unica	Media Doble	% CV Intraensayo Unico	% CV Entreensayos Unico	% CV Intraensayo Doble	% CV Entreensayos Doble
Control -	0,0440	0,0075	4,34	4,77	10,6	18,67
Control +	0,6692	0,6285	7,6	10,55	8,06	11,06
Control ++	2,38	2,32	9,23	13,92	9,18	13,95

En la tabla 5 se indica la clasificación de la consistencia de las muestras de deposiciones tomadas de los pacientes sintomáticos incluidos en este estudio. La información se presenta en relación al total de muestras y en cuanto a las muestras positivas solamente.

**Tabla 5: Consistencia de las muestras de deposiciones**

	Población total N/%	Muestras positivas N/%
Líquidas	100 (11 %)	6 (5 %)
Sueltas	371 (41 %)	67 (55 %)
Semisólidas	263 (29 %)	35 (29 %)
Sólidas	150 (17 %)	11 (9 %)
Sin clasificar	21 (2 %)	3 (2 %)

Tabla 6

Microorganismo	Absorbencia a 450 nm	
	En deposición negativa	En deposición positiva
<i>Aeromonas hydrophilia</i> ATCC 7966	0,054 (-)	0,980 (+)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0,053 (-)	0,951 (+)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 33608	0,062 (-)	0,993 (+)
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	0,054 (-)	0,902 (+)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,053 (-)	0,920 (+)
<i>Clostridium botulinum</i> ATCC 17786	0,056 (-)	0,966 (+)
<i>Clostridium butyricum</i> ATCC 8260	0,057 (-)	0,904 (+)
<i>Clostridium histolyticum</i> ATCC 19401	0,055 (-)	0,959 (+)
<i>Clostridium innocuum</i> ATCC 14501	0,054 (-)	0,990 (+)
<i>Clostridium novyi</i> ATCC 19402	0,054 (-)	0,832 (+)
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	0,055 (-)	0,984 (+)
<i>Clostridium septicum</i> ATCC 12464	0,055 (-)	1,006 (+)
<i>Clostridium sordellii</i> VPI 9048	0,280 (+)	1,124 (+)
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 3584	0,057 (-)	0,858 (+)
<i>Clostridium subterminale</i> ATCC 29748	0,058 (-)	0,891 (+)
<i>Clostridium tetani</i> ATCC 19406	0,057 (-)	0,839 (+)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,053 (-)	0,903 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	0,058 (-)	0,884 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43889	0,057 (-)	0,297 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43894	0,056 (-)	0,312 (+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43895	0,058 (-)	0,281 (+)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	0,061 (-)	0,808 (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 14207	0,056 (-)	0,835 (+)
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	0,051 (-)	0,838 (+)
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 29027	0,054 (-)	0,942 (+)
<i>Shigella flexnerii</i> ATCC 12661	0,053 (-)	0,941 (+)
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	0,056 (-)	0,969 (+)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598	0,051 (-)	1,069 (+)
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 11623	0,052 (-)	0,944 (+)
<i>Vibrio parahemolyticus</i> ATCC 17802	0,053 (-)	0,799 (+)
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	0,056 (-)	1,016 (+)

**Reactividad cruzada:** La prueba **Culturette** Toxin CD reacciona con todas las cepas toxicogénicas de referencia conocidas del *C. difficile*.<sup>15</sup> Esta prueba no entró en reacción con la cepa no toxicogénica VPI 11186. Se demostró que la reactividad cruzada era negativa con las bacterias que figuran en la tabla 6. Esta prueba se efectuó tomando deposiciones positivas y negativas en cuanto a la presencia de la toxina A del *C. difficile* y añadiendo los distintos organismos en concentraciones finales de  $10^7$  a  $10^9$  de UFC/mL de deposición. Tal como se esperaba, el único organismo con reactividad cruzada según esta prueba es un aislado altamente toxicogénico de *Clostridium sordellii* VPI 9048. Este aislado elabora grandes cantidades de toxinas hemorrágicas y letales que, según ha quedado demostrado, son similares a las toxinas A y B del *C. difficile* desde el punto de vista inmunológico y biológico. La cepa Cowan ATCC 12598 de *Staphylococcus aureus*, que produce proteína A, no presentó reactividad cruzada. Las cepas de *Escherichia coli* ATCC 43889, 43894 y 43895, que producen toxinas similares a las del género *Shigella*, tampoco presentaron reactividad cruzada.

#### DISPONIBILIDAD

##### Nº de cat. Descripción

254004 Equipo con materiales para 96 pruebas del **Culturette** Toxin CD.  
 264001 Prueba rápida de latex **Culturette CDT** para *C. difficile*. Equipo para 25 pruebas.  
 273310 Puntas de pipeta, caja de 1000 unidades.

**BIBLIOGRAFIA:** Ver "Referencias" en el texto en inglés.



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



Use by / Spotřebujete do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasznáhatóság 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 = mēnesio 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 / Autorisert 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 prietais / 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 / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik



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



Control / Kontrola / Kontrol / Controle / Kontroll / Kontrolli / Contrôle / Kontrolle / Έλεγχος / Controllo / Kontrolè / Controllo



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 / Kállaldane <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 ystačí na <n> testov / Contenido suficiente para <n> pruebas / Räckertill <n> antal tester



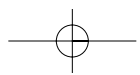
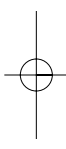
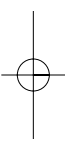
Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeda kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare 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




Negative control / Negativní kontrola / Negativ kontrol / Negatieve controle / Negatiivne kontroll / Negatiivinkontrolli / Contrôle négatif / Negative Kontrolle / Αρνητικός έλεγχος / Negativ kontroll / Controllo negativo / Neigiama kontrolė / Negativ kontroll / Kontrola ujemna / Controllo negativo / Negativna kontrola / Control negativo




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





 Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, Maryland 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

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.  
BD, BD Logo, CDT and Culturette are trademarks of Becton, Dickinson and Company © 2004 BD.