

premier®

C. difficile GDH

Enzyme immunoassay for the detection of
Clostridium difficile GDH in stool specimens

REF 611096

IVD

Rx Only

INTENDED USE

Premier *C. difficile* GDH is a qualitative enzyme immunoassay screening test to detect *Clostridium difficile* antigen, glutamate dehydrogenase, in fecal specimens from symptomatic persons suspected of having *C. difficile* infection (CDI). This test does not distinguish between toxigenic and non-toxigenic strains of *C. difficile*. Samples from symptomatic patients that produce positive results with this test must be further tested with an assay designed to detect toxigenic *C. difficile* strains and assist with the diagnosis of CDI.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Clostridium difficile has become the most important etiologic agent in nosocomial diarrhea worldwide. *C. difficile* infection (CDI) can range from mild diarrhea to life-threatening toxic megacolon. Classic risk factors for nosocomial CDI include antibiotic use and old age. Recently however CDI has been seen more frequently outside the hospital environment without the typical risk factors historically associated with *C. difficile* infection.¹ *C. difficile* produces two toxins (toxin A and toxin B) that have both been associated with disease caused by *C. difficile*. Strains of *C. difficile* that do not harbor the toxin A and toxin B genes are considered to be non-pathogenic. All strains of *C. difficile* produce glutamate dehydrogenase (GDH), also known as common antigen.^{2,3} Non-molecular laboratory approaches to *C. difficile* detection can be divided into two general groups: toxin-based and non-toxin based. Toxin-based assays include enzyme-immunoassay (EIA) for toxin A or toxins A and B and cytotoxin, which primarily detects toxin B. Non-toxin based assays, such as EIA for *C. difficile* GDH, while inherently more sensitive, must be followed up with testing for toxigenic *C. difficile*.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

Premier *C. difficile* GDH is a qualitative enzyme immunoassay screening test to detect *Clostridium difficile* antigen, glutamate dehydrogenase, in fecal specimens from symptomatic persons suspected of having *C. difficile* infection (CDI). Breakaway microwells are coated with rabbit anti-GDH antibodies. Diluted patient specimen and a horseradish peroxidase conjugated anti-GDH antibody are added to the microwells and incubated. Upon completion of the incubation, a wash step is performed to remove unbound material. If *C. difficile* GDH is present, an antibody-enzyme complex is formed. A chromagenic substrate is added to the microwells and incubated. A blue color develops in the presence of bound enzyme. Stop solution is added, changing the initial blue reaction to yellow. Test results are interpreted spectrophotometrically.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.

1. **Premier C. difficile GDH Microwells:** Polyclonal antibody-coated microwells. The antibodies are specific to *C. difficile* GDH.
2. **Premier C. difficile GDH Enzyme Conjugate:** HRP-conjugated polyclonal antibodies specific to *C. difficile* GDH in a buffered protein solution containing 0.1% ProClin® and 0.03% gentamicin as preservatives.
3. **Premier 20X Wash Buffer II:** Concentrated wash buffer containing 0.2% thimerosal as a preservative. Reagent is diluted before use.
4. **Premier Substrate I:** Buffered solution containing urea peroxide and tetramethylbenzidine at pH 5.0.
5. **Premier Stop Solution I:** 1M Phosphoric acid.
6. **Premier C. difficile GDH Sample Diluent/Negative Control:** Buffered protein solution containing 0.1% ProClin® and 0.03% gentamicin as preservatives.
7. **Premier C. difficile GDH Positive Control:** *C. difficile* GDH in a buffered protein solution containing 0.1% ProClin® and 0.03% gentamicin as preservatives.
8. Transfer pipettes
9. Microwell strip holder
10. Microwell plate sealers

MATERIALS NOT PROVIDED

1. Disposable latex gloves
2. Test tubes (eg, 10 x 75 mm or 12 x 75 mm) for dilution of sample
3. Distilled or deionized water
4. Squir bottle
5. Graduated cylinder for making 1X Wash Buffer
6. Absorbent paper
7. Waste container with disinfectant and/or autoclavable biohazard bags
8. Vortex mixer
9. Interval timer
10. EIA microplate reader capable of reading absorbance at 450 nm or 450/630 nm*
11. StatFax™-2200 Incubator/Shaker (StatFax™ is a trademark of Awareness Technology, Inc.) (optional)*
12. Semiautomated microplate washer (optional)*

* Note: It is the operator's responsibility to validate StatFax™, semiautomated plate washers and readers prior to their use with this product.

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Do not interchange the Microwells, Enzyme Conjugate, Premier Substrate I, or Positive Control reagents between lots. (The Sample Diluent/Negative Control, Premier 20X Wash Buffer II and Premier Stop Solution I are interchangeable provided the reagents are within their assigned expiration dates when used.)
3. Do not use kit components beyond labeled expiration date.
4. Do not use vials that lack a label, a lot number, or an expiration date.
5. Do not use any reagent if it is discolored or turbid. Discoloration or turbidity may be a sign of microbial contamination.
6. Allow reagents to warm to 21–27 °C before use.
7. All reagents should be mixed gently before use.
8. Hold reagent vials vertically at suitable distance above the well to insure proper drop size and delivery.
9. Replace colored caps on correct vials.
10. Do not reuse microwells.
11. Unused microwells must be placed back inside resealable pouch. It is important to protect strips from moisture.
12. The transfer pipettes provided with this kit must be used for specimen preparation and transfer. Use one per specimen.
13. Avoid splashing when dispensing diluted stool into microwells by placing the transfer pipette tip about halfway down the well and dispensing slowly down the side of well.
14. Microwell washing is to be performed precisely as directed in the assay procedure. **Inadequate washing may be the cause of elevated background in any EIA protocol.**
15. All reagents except the Premier 20X Wash Buffer II are provided already diluted to the proper concentration.
16. Any deviation below or above set incubation times may affect sensitivity and specificity and should be avoided.
17. Stool must be mixed thoroughly (regardless of consistency) to ensure a representative sample prior to pipetting.

WARNINGS

1. Patient specimens may contain infectious agents and should be handled and disposed of as potential biohazards.
2. Dispose of used wash buffer and all test materials in an appropriate container. Treat waste as a potential biohazard.
3. The Positive Control reagent contains *C. difficile* GDH. It should be handled as a potential biohazard.
4. Avoid skin contact with Premier Stop Solution I. Flush with water immediately if contact occurs.

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

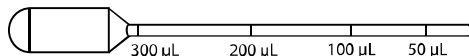
 Premier Stop Solution I	Signal Word Danger Hazard Statements H412 - Harmful to aquatic life with long lasting effects H314 - Causes severe skin burns and eye damage Precautionary Statements - EU (§28, 1272/2008) P260 - Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapors/spray P264 - Wash face, hands and any exposed skin thoroughly after handling P280 - Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection P305 + P351 + P338 - IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing P303 + P361 + P353 - IF ON SKIN (or hair): Remove/ Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower P363 - Wash contaminated clothing before reuse P304 + P340 - IF INHALED: Remove to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing P310 - Immediately call a POISON CENTER or doctor/ physician P301 + P330 + P331 - IF SWALLOWED: Rinse mouth. Do NOT induce vomiting P405 - Store locked up P501 - Dispose of contents/ container to an approved waste disposal plant.
 Premier 20X Wash Buffer II	Signal Word Danger Hazard Statements H302 – Harmful if swallowed H311 – Toxic in contact with skin Precautionary Statements - EU (§28, 1272/2008) P280 – Wear protective gloves/protective clothing
 Premier C. difficile GDH Sample Diluent / Negative Control Premier C. difficile GDH Enzyme Conjugate Premier C. difficile GDH Positive Control	Signal Word Danger Hazard Statements H314 – Causes severe skin burns and eye damage H317 – May cause an allergic skin reaction H319 – Causes serious eye irritation Contains Mixture, 3(2H)-isothiazolone, 5-chloro-2-methyl-with 2-methyl-3(2H)-isothiazolone Precautionary Statements - EU (§28, 1272/2008) P280 – Wear protective gloves/protective clothing/ eye protection/ face protection P260 – Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapors/spray P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P310 – Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician P303 + P361 + P353 – IF ON SKIN (or hair): Remove/ Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower P280 – Wear eye protection/face protection

SHELF LIFE AND STORAGE

The kit expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2–8 C and return the kit promptly to the refrigerator after each use.

PROCEDURAL NOTES

The Premier C. *difficile* GDH transfer pipette is diagrammed below.



REAGENT PREPARATION

- Bring the entire kit, including microwell pouch, to 21–27 C before use.
- Prepare 1X Wash Buffer as needed. For example: 10.0 mL of Premier 20X Wash Buffer II + 190.0 mL distilled or deionized water is sufficient to wash one strip. 1X Wash Buffer can be stored at 21–27 C for up to three months.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Human stool samples, unpreserved: Samples should be received in an airtight transport container and stored at 2–8 C prior to testing. Samples should be tested as soon as possible, but may be held up to five days at 2–8 C. (See SPECIMEN PREPARATION section for instructions on diluting samples.) Samples that will not be tested within five days should be frozen immediately upon receipt and stored at ≤ –20 C until tested. Specimens may be held frozen for up to two months and may be frozen and thawed twice.

SPECIMEN PREPARATION

Mix stool as thoroughly as possible prior to pipetting.

- Human stool samples, unpreserved:**
 - With the dropper assembly (or equivalent), add 200 µL of Sample Diluent/Negative Control to a small test tube.
 - Liquid/Semi-Solid stools:**
 - Using a transfer pipette provided with the kit, add 50 µL (first mark from pipette tip) of thoroughly mixed stool to the Sample Diluent/Negative Control test tube.
 - Vortex the mixture for a minimum of 15 seconds.
 - Save the transfer pipette in the test tube for future use.
 - Stool diluted in Sample Diluent:** If needed, stool diluted in Sample Diluent can be held at 2–27 C for up to 24 hours before testing provided the tube is sealed.
 - Stool specimens may be centrifuged after dilutions. Centrifuge at approximately 2750 x G for 3 minutes or until solid matter separates from liquid. Proceed with the assay after recovering the supernatant.

TEST PROCEDURE

1. After the pouch has reached temperature (21–27 C), break off the required number of microwells (1 well for each specimen, plus 1 positive and 1 negative control well per batch). Place the microwells in the microwell strip holder and record the location of all wells. Unused microwells must be resealed in the pouch immediately.
2. Using the specimen transfer pipette, add 100 µL of diluted stool (second mark from the tip of the pipette) to the appropriate well. (Place the pipette tip halfway into well and let the sample slowly run down side of well.)
3. Add 2 free falling drops of Positive Control. With a transfer pipette, add 100 µL (second mark from the tip of the pipette) of Sample Diluent/Negative Control to the appropriate wells.
4. Add 1 free falling drop (approximately 50 µL) of Enzyme Conjugate to each well. Firmly shake/swirl the plate for 30 seconds.
5. Cut the plate sealer to size and press it firmly onto the top of the microwells to seal. Incubate the plate for 50 minutes at 35–39 C. **Alternatively, laboratories equipped with a heated plate shaker (StatFax™-2200) can incubate and rotate the plate for 20 minutes at 37 C at 1000 rpm (setting #5).**
6. Carefully remove the plate sealer and wash the wells:
 - a. **Manual method:**
 - i. Dump the plate contents firmly into a biohazard receptacle.
 - ii. Invert and bang the plate on a clean stack of paper towels.
 - iii. Fill all wells with 1X Wash Buffer, directing a stream of buffer to the sides of the wells to avoid foaming.
 - iv. Repeat the wash cycle (dump, bang on fresh towels, fill) 4 to 6 more times for a total of 5-7 wash cycles. After the last fill, dump and bang plate on fresh towels hard enough to remove as much excess wash buffer as possible, but do not allow wells to completely dry at any time.
 - b. **Semi-automated wash method:**
 - i. Dump the plate contents firmly into a biohazard receptacle.
 - ii. Invert and bang the plate on a clean stack of paper towels, then place empty plate on washer device.
 - iii. Fill the wells to the top (approx. 300-350 µL/well) with 1X Wash Buffer and then aspirate. The washer manifold should be adjusted to ensure no foaming occurs during the filling of the wells and that the wells are thoroughly aspirated after each wash.
 - iv. Repeat step iii 4 more times. Following the last wash, test wells should be thoroughly aspirated to remove as much moisture as possible, but do not allow wells to completely dry at any time.
7. Add 2 free-falling drops (approximately 100 µL) of Premier Substrate I to each well. Firmly shake/swirl the plate for 30 seconds. Incubate the plate for 10 minutes at 21–27 C.
8. Add 2 free-falling drops (approximately 100 µL) of Premier Stop Solution I to each well. Firmly shake/swirl the plate for 30 seconds. **Note:** The initial color of a positive reaction is blue, which changes to yellow upon addition of Premier Stop Solution I.
9. Clean the underside of all wells with a lint-free tissue.
10. Inspect and record reactions. Test results should be read using a spectrophotometric reader. Zero EIA reader on air. Read absorbance at 450 nm or 450/630 nm within 30 minutes of adding Premier Stop Solution I.
11. Suspect failure of the washing method or device if the Negative and/or Positive Controls consistently produce out-of-specification results. Increasing the number of washes, washing more vigorously, decanting more thoroughly or recalibrating washing devices should correct the problem. If problems persist, contact Meridian's Technical Support Services at 800-343-3858 (USA) or your authorized Meridian distributor for assistance.

INTERPRETATION OF RESULTS

Spectrophotometric Single Wavelength (450 nm)

Negative:	< 0.200
Positive:	≥ 0.200
Negative Control:	< 0.150
Positive Control:	≥ 0.600

Spectrophotometric Dual Wavelength (450/630 nm)

Negative:	< 0.150
Positive:	≥ 0.150
Negative Control:	< 0.100
Positive Control:	≥ 0.600

If a Negative Control is < 0.000, reblank the plate reader to air and reread the plate.

A positive result indicates the presence of *C. difficile* GDH. A negative result indicates the absence of *C. difficile* GDH, or that the level of GDH is below what can be detected by the assay. The magnitude of the OD above the cutoff is neither indicative of the severity or extent of *C. difficile* infection, nor can it be correlated to an endpoint titer. Extremely strong positive samples may yield either an intense yellow color or a purple precipitate within a few minutes of stopping the reaction. In this case, the spectrophotometer may yield an "out" reading. This reading is considered a positive.

If the frequency of low positive results (OD between 0.200 and 0.250 for single wavelength and between 0.150 and 0.200 with dual wavelength) is greater than 5% of specimens tested, this may indicate insufficient washing. More vigorous washing or increasing the washes to seven washes in step 6 of the procedure is recommended.

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

1. At the time of each use, kit components should be visually examined for obvious signs of microbial contamination, freezing or leakage. Do not use contaminated or suspect reagents.
2. The performance of Premier *C. difficile* GDH should be verified using the Positive Control and Sample Diluent/Negative Control with each test batch. See the INTERPRETATION OF RESULTS section above for a description of the expected results for control reagents. Tests should be considered invalid when either control reagent does not produce the expected results. In such cases, repeat tests and controls. If, on repeat testing, the expected reactions are still not observed with in-date reagents, call Meridian's Technical Support Services at 800-343-3858 (USA) or your authorized Meridian distributor for assistance.
3. The controls are used to monitor reagent reactivity. Failure of the controls to produce the expected results can mean that one or more of the reagents are no longer reactive at the time of use, the test was not performed correctly, or that reagents or samples were not added. **If the expected control reactions are not observed, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.**
4. Specimen matrix interference has not been observed in this assay as samples are significantly diluted before testing in Sample Diluent. For this reason, the Positive and Negative Controls supplied as part of this assay are prepared in matrices similar to the Sample Diluent. If control materials that are identical in composition to test samples are preferred, the user can prepare these by diluting known positive and negative specimens in Sample Diluent according to the SPECIMEN PREPARATION section of this insert. Add 100 µL of user prepared controls to test wells.

EXPECTED VALUES

The frequency of antibiotic-associated diarrhea caused by *C. difficile* is dependent on several factors including: patient population, type of institution and epidemiology. The reported incidence of *C. difficile* infection in patients suspected of having antibiotic-associated diarrhea is 15-25%⁴ although different facilities may find positivity rates outside this range.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. For in vitro diagnostic use only.
2. The test is qualitative and no quantitative interpretation should be made with respect to the values.
3. A positive result does not define the existence of *C. difficile* disease or the presence of toxigenic *C. difficile*, but only indicates the detection of the organism. All Premier *C. difficile* GDH positive stools should be tested to verify the presence of toxigenic *C. difficile*.
4. Overincubation of the tests may lead to an increase in false-positive test results. Conversely, incubation for periods less than those defined in this insert can result in an increase in false-negative tests. Follow incubation times defined in this insert.
5. *Staphylococcus aureus* (Cowan strain I) and *Clostridium sporogenes* were found to be crossreactive with Premier *C. difficile* GDH.
6. This test is for use with unformed unpreserved stool samples only. Performance characteristics of other clinical specimen types have not been established.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Premier *C. difficile* GDH was evaluated by five independent test sites located in the Southwestern, Southeastern, and Midwestern regions of the United States. A total of 733 qualified patient samples were evaluated; all specimens were prospectively collected samples. Samples were collected from males (46%) and females (53%). In the case of 1% of the patients, the gender was not known. The age groups of the patients ranged from 22 days to 99 years of age. No differences in test performance were observed based on patient age or gender. The following tables show the assay performance by clinical site and patient age.

Table 1. Performance characteristics by clinical site

Site	Positive Samples			Negative Samples		
	Premier GDH/ Culture	Sensitivity %	95% CI	Premier GDH/ Culture	Specificity %	95% CI
Total Sites	108/117	92.3%	86.0 – 95.9%	590/616	95.8%	93.9 – 97.1%
Site 1	13/16	81.3%	57.0 – 93.4%	84/87	96.6%	90.3 – 98.8%
Site 2	28/30	93.3%	78.7 – 98.2%	132/140	94.3%	89.1 – 97.1%
Site 3	44/46	95.7%	85.5 – 98.8%	147/153	96.1%	91.7 – 98.2%
Site 4	15/15	100.0%	79.6 – 100.0%	169/175	96.6%	92.7 – 98.4%
Site 5	8/10	80.0%	49.0 – 94.3%	58/61	95.1%	86.5 – 98.4%

- Discrepant specimens were evaluated using an FDA-cleared ELISA test for the detection of *C. difficile* GDH.
- Sixteen of the 26 false positive specimens were positive when tested with another FDA cleared GDH assay.
- Eight of the nine false negative specimens were negative when tested with another FDA cleared GDH assay.

Table 2. Performance characteristics by patient age

Patient Age	Positive Samples			Negative Samples		
	Premier GDH/ Culture	Sensitivity %	95% CI	Premier GDH/ Culture	Specificity %	95% CI
0-28 days	0/0	N/A	N/A	1/1	100.0%	20.7 – 100.0%
29 days to 2 years	22/24	91.7%	74.2 – 97.7%	56/60	93.3%	84.1 – 97.4%
> 2 years to < 12 years	24/25	96.0%	80.5 – 99.3%	106/109	97.2%	92.2 – 99.1%
12 years to < 18 years	9/11	81.8%	52.3 – 94.9%	59/61	96.7%	88.8 – 99.1%
18 years to 21 years	3/4	75.0%	30.1 – 95.4%	22/23	95.7%	79.0 – 99.2%
> 21 years	50/53	94.3%	84.6 – 98.1%	345/361	95.6%	92.9 – 97.3%
Not Defined	0/0	N/A	N/A	1/1	100.0%	20.7 – 100.0%

REPRODUCIBILITY

Assay precision, intra-assay variability and inter-assay variability were assessed with a reference panel prepared from pools of negative samples spiked with *C. difficile* GDH antigen. The reproducibility panel consisted moderately positive (n=3), low positive (n=3), high negative (n=3), and negative (n=1) specimens. The low positive and high negative specimens were prepared near the assay limit of detection. Each sample was evaluated twice per day for five days by three different laboratories. Reproducibility was 100% with no intra-assay and inter-assay variability for samples prepared above or below the limit of detection for the assay.

CROSSREACTIVITY STUDIES

Crossreactivity studies were performed with positive and negative stool specimens inoculated with bacterial or fungal organisms to a final concentration of 1.2×10^8 CFU/mL or virus concentration greater than 1×10^5 TCID₅₀/mL. None of the following organisms in stool reacted with Premier *C. difficile* GDH:

Aeromonas hydrophila, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium bifementans*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Group B, *Salmonella* Group C, *Salmonella* Group D, *Salmonella* Group E, *Serratia liquifaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Type 40, Adenovirus Type 41, Coxsackievirus Strain B4, Echovirus Strain 11, Rotavirus Strain WA

Stools spiked with *Staphylococcus aureus* (Cowan strain I) and *Clostridium sporogenes*, were found to be crossreactive with Premier *C. difficile* GDH.

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity of the Premier *C. difficile* GDH test is 8 ng/mL when spiked in stool.

ASSAY REACTIVITY

The following *C. difficile* stock cultures from different sources were tested and produced positive reactions at 5.7×10^7 CFU/mL with Premier *C. difficile* GDH:

Toxigenic *C. difficile* strains: 8864, 10463, 43598, 2004052, 2004111, 2004118, 2004205, 2004206, 2005070, 2005257, 2005325, 2006240, 2007431, 2007435, 2007858, 2008016, 2008029, 2008162, 2008188, 2008341, 2008351, 2009018, 2009065, 2009066, 2009099, 2009132, 2009155, 2009277, B1, B17, B18, BK6, CF1, G1, J7, K12, Y1

Non-toxigenic *C. difficile* strains: 11186, 234, 586, 611, 620, 2C62, 2C165, C122, UNC19904, X15076

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

The following substances, at the specified saturated solvent/diluent concentrations, do not interfere with test results in the final concentrations listed:

Barium sulfate at 5 mg/mL, Stearic acid/Palmitic acid (fecal fat) at 2.65mg/mL/1.3 mg/mL, Hemoglobin at 3.2 mg/mL, Imodium AD® (Loperamide HCl) at 6.67×10^{-3} mg/mL, Kaopectate® (Bismuth subsalicylate) at 0.87 mg/mL, Metronidazole at 12.5 mg/mL, Mucin at 3.33 mg/mL, Mylanta® (Ammonium hydroxide w/ magnesium hydroxide) at 4.2 mg/mL, Pepto Bismol® (Bismuth subsalicylate) at 0.87 mg/mL, Polyethylene glycol 3350 at 79.05 mg/mL, Prilosec® (Omeprazole) at 0.5 mg/mL, Simethicone at 0.625 mg/mL, Tagamet® (Cimetidine) at 0.5 mg/mL, Tums® (Calcium carbonate) at 0.5 mg/mL, Vancomycin hydrochloride at 2.5 mg/mL, White blood cells at 5%, Whole blood at 25%

premier®

C. difficile GDH

Test immunoenzimatico per la rilevazione di antigene
GDH di *Clostridium difficile* in campioni fecali

REF 611096

IVD

Rx Only

FINALITÀ D'USO

Premier C. difficile GDH è un test immunoenzimatico qualitativo di screening per la rilevazione dell'antigene di *Clostridium difficile*, glutammato deidrogenasi, in campioni di feci umane provenienti da pazienti sintomatici per i quali si sospetta una infezione da C. difficile (CDI). Il test non è in grado di distinguere tra ceppi tossigenici e ceppi non tossigenici di C. difficile. I campioni di pazienti sintomatici che risultano positivi a questo test devono essere successivamente analizzati con metodiche in grado di confermare la presenza di C. difficile tossigenico consentendo di formulare una diagnosi.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Clostridium difficile è diventato il più importante agente eziologico della diarrea nosocomiale in tutto il mondo. L'infezione da C. difficile (CDI) può manifestarsi come diarrea lieve fino ad arrivare a sintomatologie molto più gravi come il megacolon tossico potenzialmente letale. I tipici fattori di rischio per la CDI nosocomiale includono l'assunzione di antibiotici e l'età avanzata. Tuttavia di recente la CDI si è manifestata più frequentemente in ambienti al di fuori di quelli ospedalieri, senza i tipici fattori di rischio storicamente associati all'infezione da C. difficile.¹ C. difficile produce due tossine (tossina A e tossina B), entrambe associate alle infezioni causate da C. difficile. I ceppi di C. difficile che non sono portatori dei geni della tossina A e della tossina B sono considerati non patogeni. Tutti i ceppi di C. difficile producono glutammato deidrogenasi (GDH), nota anche come antigene comune.^{2, 3} Gli approcci diagnostici non molecolari per la ricerca di C. difficile si suddividono in due gruppi principali: metodiche basate sulla rilevazione delle tossine e metodiche non basate sulla rilevazione delle tossine. I test per le tossine comprendono i test immunoenzimatici (EIA) per la tossina A o per le tossine A e B e i test per la citotossicità, che rilevano principalmente la tossina B. I test non basati sulla ricerca delle tossine, come i test EIA per C. difficile GDH, benché più sensibili, devono essere seguiti da un test per la rilevazione di C. difficile tossinogenico.

PRINCIPI BIOLOGICI

Premier C. difficile GDH è un test immunoenzimatico qualitativo di screening per la rilevazione dell'antigene di *Clostridium difficile*, glutammato deidrogenasi, in campioni di feci umane provenienti da pazienti sintomatici per i quali si sospetta una infezione da C. difficile (CDI). Il campione diluito del paziente e un anticorpo coniugato con perossidasi di rafano-GDH vengono aggiunti ai micropozzetti e lasciati incubare. Al termine dell'incubazione, i micropozzetti vengono lavati per eliminare il materiale non legato. Se l'antigene di C. difficile è presente, si forma un complesso anticorpo-enzima. Un substrato cromogeno viene quindi aggiunto nei micropozzetti e lasciato incubare. La comparsa del colore blu indica la presenza di un enzima legato. Viene poi aggiunta la soluzione di arresto ed il colore della reazione vira dal blu al giallo. I risultati del test devono essere interpretati con un lettore spettrofotometrico.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

1. **Premier C. difficile GDH - Micropozzetti:** Micropozzetti rivestiti con anticorpi policlonali. Gli anticorpi sono specifici per l'antigene (GDH) di C. difficile.
2. **Premier C. difficile GDH - Coniugato Enzimatico:** Anticorpi policlonali coniugati con perossidasi di rafano specifici per l'antigene (GDH) di C. difficile in soluzione proteica tamponata contenente ProClin® (0,1%) e gentamicina (0,03%) come conservanti.
3. **Premier Tampone di Lavaggio II (20X):** Soluzione tampone di lavaggio concentrata contenente thimerosal (0,2%) come conservante. Il reagente deve essere diluito prima dell'uso.
4. **Premier Substrato I:** soluzione tamponata contenente perossido di urea e tetrametilbenzidina a pH 5.0.
5. **Premier Soluzione di Arresto I:** Acido fosforico 1M.
6. **Premier C. difficile GDH - Diluente del Campione/Controllo Negativo:** Soluzione proteica tamponata contenente ProClin® (0,1%) e gentamicina (0,03%) come conservanti.
7. **Premier C. difficile GDH - Controllo Positivo:** Antigene (GDH) di C. difficile in una soluzione proteica tamponata contenente ProClin® (0,1%) e gentamicina (0,03%) come conservanti.
8. Pipette di trasferimento
9. Supporto per micropozzetti
10. Pellicola sigillante per micropozzetti

MATERIALI NON FORNITI

1. Guanti di lattice monouso
2. Provette (10 x 75 mm o 12 x 75 mm) per la diluizione dei campioni
3. Acqua distillata o deionizzata
4. Spruzzetta per i lavaggi
5. Cilindro graduato per la preparazione della soluzione tampone di lavaggio 1X
6. Carta assorbente
7. Contenitore per scarti con disinfettante e/o buste per smaltimento di materiali biologici in autoclave
8. Vortex
9. Timer
10. Lettore per micropiastre EIA in grado di rilevare assorbanza a 450 nm o 450/630 nm
11. Agitatore/Incubatore di piastre termostato, es StatFax™-2200 (StatFax™ marchio registrato di Awareness Technology, Inc.)* (facoltativo)*
12. Dispositivo di lavaggio semiautomatico per micropiastre (facoltativo)*

*Nota: è responsabilità dell'operatore provvedere alla validazione del protocollo per l'utilizzo di agitatore /incubatore e lavatore semi-automatico prima dell'utilizzo di questo prodotto

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. Non scambiare i micropozzetti, il Coniugato Enzimatico, il Substrato I o il Controllo Positivo tra lotti diversi. (Il Diluente del campione/Controllo Negativo, la Soluzione di lavaggio II 20X e la Soluzione di Arresto I sono intercambiabili purché siano utilizzati entro la data di scadenza).
3. Non usare i componenti del kit oltre la data di scadenza.
4. Non usare flaconi privi di etichetta, numero di lotto o data di scadenza.
5. Non usare un reagente se appare scolorito o torbido, in quanto ciò potrebbe indicare la presenza di una contaminazione microbica.
6. Prima dell'uso, lasciare che i reagenti raggiungano una temperatura compresa fra 21 e 27 °C.
7. Mescolare delicatamente tutti i reagenti prima dell'uso.
8. Mantenere i flaconi dei reagenti in posizione verticale ad un'adeguata distanza sopra il pozzetto per assicurarne portata e dosaggio corretti.
9. Richiudere i flaconi con gli appropriati tappi colorati.
10. Non riutilizzare i micropozzetti.
11. I micropozzetti non utilizzati vanno conservati nella busta sigillabile, al fine di proteggere le strisce dall'umidità.
12. Le pipette di trasferimento fornite con questo kit vanno usate per la preparazione e il trasferimento dei campioni. Usare una pipetta per ciascun campione.
13. Al fine di evitare spruzzi durante la dispensazione dei campioni diluiti nei micropozzetti, inserire la punta della pipetta di trasferimento fino a raggiungere la metà circa dal fondo del pozzetto e dispensare lentamente il campione verso le pareti del pozzetto stesso.
14. Il lavaggio dei micropozzetti va eseguito esattamente come indicato nella procedura del test. **Un lavaggio insufficiente potrebbe causare la presenza di un background elevato, così come in ogni test EIA.**
15. Tutti i reagenti, eccetto la Soluzione di lavaggio II (20X), sono forniti già diluiti alla concentrazione d'uso.
16. Qualsiasi deviazione dai tempi di incubazione indicati può influire sulla sensibilità e sulla specificità del test e va pertanto evitata.

I campioni fecali devono essere mescolati a fondo, a prescindere dalla consistenza, al fine di ottenere un adeguato campione rappresentativo prima della dispensazione.

AVVERTENZE

1. I campioni dei pazienti possono contenere agenti infettivi, pertanto vanno maneggiati ed eliminati come materiale biologico potenzialmente pericoloso.
2. Eliminare in un apposito contenitore la soluzione di lavaggio e tutti i materiali usati per il test. Tutto il materiale di scarto va considerato come materiale biologico potenzialmente pericoloso.
3. Il Controllo Positivo contiene antigene (GDH) di *C. difficile*. Deve essere maneggiato come materiale biologico potenzialmente pericoloso.
4. Evitare che la Soluzione di Arresto I entri in contatto con la pelle. In caso di contatto, lavare immediatamente con acqua.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

 Premier Stop Solution I	avvertenza Pericolo indicazioni di pericolo H412 - Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata H314 - Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari Consigli di Prudenza - UE (§28, 1272/2008) P260 - Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol P264 - Lavare accuratamente viso, mani ed eventuale superficie cutanea esposta dopo l'uso P280 - Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso. P305 + P351 + P338 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare P303 + P361 + P353 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/ fare una doccia. P363 - Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente P304 + P340 - IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione P310 - Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico P301 + P330 + P331 - IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito P405 - Conservare sotto chiave P501 - Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto di smaltimento approvato
--	---

 Premier C. difficile GDH 20X Wash Buffer II	Avvertenza Pericolo Indicazioni di Pericolo H302 – Nocivo se ingerito H311 – Tossico per contatto con la pelle Consigli di Prudenza – UE (§28, 1272/2008) P280 – Indossare guanti protettivi/ indumenti protettivi
--	---

 Premier C. difficile GDH Sample Diluent / Negative Control Premier C. difficile GDH Enzyme Conjugate Premier C. difficile GDH Positive Control	Avvertenza Pericolo Indicazioni di Pericolo H314 – Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari H317 – Può provocare una reazione allergica cutanea H319 – Provoca grave irritazione oculare Contiene Mixture, 3(2H)-isothiazolone, 5-chloro-2-methyl- with 2-methyl-3(2H)-isothiazolone Consigli di Prudenza – UE (§28, 1272/2008) P280 – Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso P260 – Non respirare la polvere o la nebbia P305 + P351 + P338 – IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare P310 – Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico P303 + P361 + P353 – IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/ fare una doccia. P280 – Indossare protezione per occhi/ protezione facciale
---	---

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta. Conservare il kit a 2–8 C e riporlo nel frigorifero immediatamente dopo l'uso.

NOTE PROCEDURALI

Il diagramma seguente mostra la pipetta di trasferimento Premier C. difficile GDH.



PREPARAZIONE DEI REAGENTI

1. Portare l'intero kit, inclusa la busta dei micropozzetti, a temperatura ambiente (21–27 C) prima dell'uso.
2. Preparare il Tampone di Lavaggio 1X secondo necessità. Ad esempio: 10,0 mL di Tampone di Lavaggio II (20X) + 190,0 mL di acqua distillata o deionizzata sono sufficienti per lavare una striscia. Tampone di Lavaggio 1X può essere conservato a 21–27 C fino a tre mesi.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Campioni di feci umane, senza conservanti: i campioni devono essere trasportati in un contenitore ermetico e conservati a 2–8 C prima dell'analisi. I campioni devono essere analizzati il prima possibile, ma possono essere conservati a 2–8 C fino a un massimo di cinque giorni. (Vedere la sezione PREPARAZIONE DEI CAMPIONI per le istruzioni sulla diluizione dei campioni). Se non fosse possibile eseguire l'analisi entro cinque giorni, congelare i campioni immediatamente dopo l'arrivo e conservarli a ≤ –20 C fino al momento dell'analisi. I campioni possono essere conservati congelati fino a due mesi e possono essere congelati e scongelati due volte.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Miscelare bene le feci il prima di pipettare.

1. **Campioni di feci umane, senza conservanti:**
 - a. Con l'aiuto del contagocce (o uno strumento equivalente), aggiungere 200 µL di Diluente del Campione/Controllo Negativo in una provetta piccola.
 - b. **Feci liquide/semisolide:**
 - i. Usando una pipetta di trasferimento fornita con il kit, aggiungere 50 µL (prima tacca dalla punta della pipetta) di campione fecale ben miscelato nella provetta contenente il Diluente del Campione/Controllo Negativo.
 - ii. Agitare la miscela con il vortex per almeno 15 secondi.
 - iii. Porre la pipetta di trasferimento nella provetta, per utilizzarla in seguito.
 - c. **Campione fecale diluito nel Diluente del campione:** se necessario, il campione fecale diluito nel diluente del campione può essere conservato a 2–27 C fino a 24 ore prima dell'analisi, a patto che la provetta sia sigillata.
 - d. I campioni fecali possono essere centrifugati dopo la diluizione. Centrifugare a circa 2750 x G per 3 minuti o fino a quando la materia solida si separa dal liquido. Eseguire l'analisi dopo aver recuperato il sovrantante.

PROCEDURA DEL TEST

1. Dopo che la busta ha raggiunto la temperatura ambiente (21–27 °C), prelevare un numero di micropozzetti sufficiente (per ogni seduta 1 pozzetto per ciascun campione, più 1 per il controllo positivo e 1 per il Controllo Negativo di ciascun gruppo). Inserire i micropozzetti nel supporto porta strip e annotare la posizione di ciascun pozzetto. I micropozzetti non utilizzati devono essere reinseriti e sigillati immediatamente nella busta.
2. Usando la pipetta di trasferimento del campione, aggiungere 100 µL di campione fecale diluito (seconda tacca dalla punta della pipetta) nel pozzetto corrispondente. (Inserire la punta della pipetta fino a raggiungere la metà dal fondo del pozzetto e dispensare lentamente il campione verso le pareti del pozzetto stesso).
3. Aggiungere 2 gocce di Controllo Positivo al pozzetto corrispondente. Con una pipetta di trasferimento, aggiungere 100 µL (seconda tacca dalla punta della pipetta) di Diluente del Campione/Controllo Negativo nei pozzetti corrispondenti.
4. Aggiungere 1 goccia (circa 50 µL) di Coniugato Enzimatico in ciascun pozzetto. Agitare/ruotare bene la piastra per 30 secondi.
5. Tagliare una parte adeguata di pellicola sigillante e applicarla bene sopra i micropozzetti per sigillarli. Incubare la piastra per 50 minuti a 35-39 °C. **In alternativa, i laboratori dotati di un agitatore con piastra riscaldante (StatFax™-2200) possono incubare e far ruotare la piastra per 20 minuti a 37 °C a 1000 rpm (posizione #5).**
6. Rimuovere con attenzione la pellicola sigillante e lavare i pozzetti:
 - a. **Metodo manuale:**
 - i. Svuotare il contenuto della piastra in un contenitore per materiale biologico potenzialmente pericoloso.
 - ii. Rovesciare e scuotere la piastra su una pila di carta assorbente pulita.
 - iii. Riempire tutti i pozzetti con il Tampone di Lavaggio 1X, dirigendo il flusso del tampone verso le pareti dei pozzetti per evitare la formazione di schiuma.
 - iv. Ripetere il ciclo di lavaggio (versare, scuotere su carta assorbente pulita, riempire) 4 o 6 volte per un totale di 5-7 cicli di lavaggio. Dopo l'ultimo ciclo, svuotare e scuotere energicamente la piastra su carta assorbente pulita per rimuovere il tampone di lavaggio in eccesso, ma evitare che i pozzetti si asciughino completamente.
 - b. **Metodo di lavaggio semi automatico:**
 - i. Svuotare il contenuto della piastra in un contenitore per materiale biologico potenzialmente pericoloso.
 - ii. Rovesciare e scuotere la piastra su una pila di carta assorbente pulita, quindi inserire la piastra vuota nel dispositivo di lavaggio.
 - iii. Riempire i pozzetti fino al bordo (circa 300-350 µL/pozzetto) con il Tampone di Lavaggio 1X, quindi aspirare. Il collettore del dispositivo di lavaggio va regolato in modo da evitare la formazione di schiuma nel corso del riempimento dei pozzetti e in modo da aspirare completamente i pozzetti dopo ciascun ciclo di lavaggio.
 - iv. Ripetere il punto iii altre 4 volte. Dopo l'ultimo lavaggio, aspirare a fondo i pozzetti per rimuovere quanta più umidità possibile, ma evitare che i pozzetti si asciughino completamente.
7. Aggiungere 2 gocce (circa 100 µL) di Premier Substrato I in ciascun pozzetto. Agitare/ruotare bene la piastra per 30 secondi. Incubare la piastra per 10 minuti a 21–27 °C.
8. Aggiungere 2 gocce (circa 100 µL) di Soluzione di Arresto I in ciascun pozzetto. Agitare/ruotare bene la piastra per 30 secondi. **Nota:** la reazione positiva sviluppa inizialmente un colore blu, che diventa giallo dopo l'aggiunta della Soluzione di Arresto I.
9. Pulire il fondo esterno dei pozzetti con un panno pulito che non lasci pelucchi.
10. Osservare e annotare le reazioni. I risultati del test devono essere letti tramite un lettore spettrofotometrico. Azzerare il lettore EIA contro aria. Leggere l'assorbanza a 450 nm o 450/630 nm entro 30 minuti dopo l'aggiunta della Soluzione di Arresto I.
11. Se i Controlli Positivi e Negativi forniscono ripetutamente risultati fuori dalle specifiche si devono sospettare un difetto nel dispositivo o nella procedura di lavaggio. Il problema dovrebbe essere risolto incrementando il numero di lavaggi, lavando più vigorosamente, svuotando in modo energico la piastra o ricalibrando il dispositivo di lavaggio. Se il problema persiste, contattare il Servizio di Assistenza Tecnica Meridian (in Italia 0331433636) o il distributore autorizzato di zona.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Lettura spettrofotometrica a singola lunghezza d'onda (450 nm)

Negativo:	< 0,200
Positivo:	≥ 0,200
Controllo Negativo:	< 0,150
Controllo Positivo:	≥ 0,600

Lettura spettrofotometrica a doppia lunghezza d'onda (450/630 nm)

Negativo:	< 0,150
Positivo:	≥ 0,150
Controllo Negativo:	< 0,100
Controllo Positivo:	≥ 0,600

Se un Controllo Negativo è pari a < 0,000, riazzerare il lettore contro aria e ripetere la lettura della piastra.

Un risultato positivo indica la presenza dell'antigene (GDH) di *C. difficile*. Un risultato negativo indica l'assenza dell'antigene (GDH) di *C. difficile*, o un livello dell'antigene inferiore al limite di rilevazione del test. Un valore di OD superiore al cutoff non è indicativo della severità o dell'entità dell'infezione da *C. difficile*, né può essere correlato con un titolo di positività. Reazioni positive molto forti possono sviluppare un colore giallo intenso o un precipitato color porpora entro pochi minuti dall'aggiunta della Soluzione di Arresto I. In questo caso, lo spettrofotometro potrebbe indicare un risultato "fuori dai limiti". Questo risultato deve essere considerato positivo.

Se la frequenza di risultati positivi bassi (OD fra 0,200 e 0,250 per singola lunghezza d'onda e fra 0,150 e 0,200 per doppia lunghezza d'onda) è superiore al 5% di campioni analizzati, potrebbe indicare un lavaggio insufficiente. Si raccomanda di eseguire lavaggi più energici o di aumentare i cicli di lavaggio a sette lavaggi al Punto 6 della procedura.

CONTROLLO QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

1. Ad ogni utilizzo, esaminare visivamente i componenti del kit per controllare che non vi siano segni di contaminazione microbica, congelamento o perdite. Non usare reagenti contaminati o sospetti.
2. Le prestazioni di Premier *C. difficile* GDH devono essere verificate usando il Controllo Positivo e il Diluente del Campione/Controllo Negativo con ciascuna seduta di analisi. Vedere la sezione INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI sopra indicata per la descrizione dei risultati attesi con i reagenti di controllo. Le analisi devono essere considerate non valide quando anche solo uno dei due reagenti di controllo non produce i risultati attesi. In questi casi, è necessario ripetere l'analisi e i controlli. Se, dopo aver ripetuto l'analisi, non si ottengono ancora i risultati attesi usando i reagenti entro la data di scadenza, chiamare il Servizio di Assistenza Tecnica Meridian o il distributore autorizzato di zona.
3. I controlli servono a verificare la reattività dei reagenti. Risultati diversi da quelli attesi possono indicare: che un reagente o più non è reattivo al momento dell'uso, che l'analisi non è stata eseguita correttamente, oppure che i reagenti o i campioni non sono stati aggiunti. **Se non si ottengono i risultati attesi con i Controlli, come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il distributore Locale, (Italia +390331433636).**
4. In questo test non è stata osservata l'interferenza della matrice dei campioni, in quanto i campioni vengono notevolmente diluiti prima dell'analisi nel Diluente del Campione. Per questo motivo i reagenti di Controllo Positivo e Negativo prodotti per questo test sono preparati in matrici simili a quella del Diluente del Campione. Se per le analisi dei campioni si preferisce usare materiali di controllo di composizione identica a quella dei campioni stessi, l'utilizzatore può prepararli diluendo i campioni noti positivi e negativi nel Diluente del Campione secondo le istruzioni indicate nella sezione PREPARAZIONE DEI CAMPIONI di questo inserto. Aggiungere 100 µL di materiale di controllo preparato dall'utilizzatore nei pozzetti di analisi.

VALORI ATTESI

La frequenza di diarrea associata ad antibiotici causata da *C. difficile* dipende da vari fattori, fra cui: popolazione dei pazienti, tipo di struttura ospedaliera ed epidemiologia. L'incidenza di infezione associata a *C. difficile* riportata in pazienti con sospetta diarrea associata all'uso di antibiotici è pari al 15-25%⁴ benché sia possibile riscontrare percentuali positive al di fuori di questo intervallo in strutture diverse.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. Il test è qualitativo, quindi i valori ottenuti non devono essere interpretati in modo quantitativo.
3. Un risultato positivo non implica la presenza di infezione da *C. difficile* o la presenza di *C. difficile* tossigenico, ma indica semplicemente il rilevamento dell'organismo. Tutti i campioni fecali che producono risultati positivi con Premier *C. difficile* GDH devono essere ulteriormente analizzati per verificare la presenza di un ceppo di *C. difficile* tossigenico.
4. Una tempo di incubazione eccessivo può produrre un numero elevato di risultati falso-positivi. D'altra parte, periodi di incubazione inferiori a quanto indicato in questo inserto possono produrre un numero maggiore di risultati falso-negativi. Attenersi ai tempi di incubazione indicati in questo inserto.
5. *Staphylococcus aureus* (ceppo Cowan I) e *Clostridium sporogenes* risultano cross reagire con Premier *C. difficile* GDH.
6. Questo test deve essere utilizzato solo su feci fresche (senza fissativi o terreni di trasporto) e non formate. Non sono state valutate le prestazioni del test su altri tipi di campione.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PRESTAZIONI

Premier C. difficile GDH è stato valutato in cinque siti indipendenti nelle regioni Su-Ovest, Sud-Est e Centro-Occidentale degli Stati Uniti. Sono stati analizzati un totale di 733 campioni idonei; tutti i campioni sono stati raccolti con modalità prospettiche. I campioni sono stati ottenuti da uomini (46%) e donne (53%). Nell' 1% dei pazienti il sesso non è noto. L'età dei pazienti varia da 22 mesi a 99 anni. Non si sono evidenziate differenze nelle prestazioni del test in base alla fascia di età o in base al sesso dei pazienti. Le tabelle di seguito riportate riassumono i risultati per sito e per fascia di età.

Tabella 1. Prestazioni caratteristiche per sito

Sito	Campioni Positivi			Campioni Negativi		
	Premier GDH vs Coltura	Sensibilità %	95% CI	Premier GDH vs Coltura	Specificità%	95% CI
totale	108/117	92,3%	86,0 – 95,9%	590/616	95,8%	93,9 – 97,1%
Sito 1	13/16	81,3%	57,0 – 93,4%	84/87	96,6%	90,3 – 98,8%
Sito 2	28/30	93,3%	78,7 – 98,2%	132/140	94,3%	89,1 – 97,1%
Sito 3	44/46	95,7%	85,5 – 98,8%	147/153	96,1%	91,7 – 98,2%
Sito 4	15/15	100,0%	79,6 – 100,0%	169/175	96,6%	92,7 – 98,4%
Sito 5	8/10	80,0%	49,0 – 94,3%	58/61	95,1%	86,5 – 98,4%

- I campioni discrepanti sono stati valutati usando un test ELISA per C. difficile GDH approvato FDA.
- Sedici dei 26 campioni falsi positivi sono Risultati positivi quando analizzati con un altro test ELISA per C. difficile GDH approvato FDA.
- Otto dei nove campioni falsi negativi sono risultati negativi quando analizzati con un altro test ELISA per C. difficile GDH approvato FDA

Tabella 2. Prestazioni caratteristiche per fascia di età

Età	Campioni Positivi			Campioni Negativi		
	Premier GDH vs Coltura	Sensibilità %	95% CI	Premier GDH vs Coltura	Specificità%	95% CI
0-28 giorni	0/0	N/A	N/A	1/1	100,0%	20,7 – 100,0%
Da 29 giorni a 2 anni	22/24	91,7%	74,2 – 97,7%	56/60	93,3%	84,1 – 97,4%
> 2 anni a < 12 anni	24/25	96,0%	80,5 – 99,3%	106/109	97,2%	92,2 – 99,1%
12 anni a < 18 anni	9/11	81,8%	52,3 – 94,9%	59/61	96,7%	88,8 – 99,1%
18 anni a 21 anni	3/4	75,0%	30,1 – 95,4%	22/23	95,7%	79,0 – 99,2%
> 21 anni	50/53	94,3%	84,6 – 98,1%	345/361	95,6%	92,9 – 97,3%
ND	0/0	N/A	N/A	1/1	100,0%	20,7 – 100,0%

RIPRODUCIBILITÀ

L'accuratezza del test, la variabilità intra-saggio e la variabilità inter-saggio sono stati stabiliti in base ad un pannello di riferimento preparato da un pool di campioni negativi inoculati con antigene C. difficile GDH. Il pannello per la riproducibilità consisteva in campioni moderatamente positivi (n=3), debolmente positivi (n=3), alto negativi (n=3) e negativi (n=1). Gli ultimi sono stati preparati vicino al limite di rilevazione del saggio. Ciascun campione è stato valutato due volte al giorno per cinque giorni da tre diversi laboratori. La riproducibilità è stata pari al 100% con nessuna variabilità inter-saggio ed intra-saggio per i campioni preparati al di sopra o al di sotto il limite di rilevazione del saggio.

STUDI SULLA CROSS-REATTIVITÀ

Studi sulla cross-reattività sono stati eseguiti utilizzando campioni fecali positivi e negativi inoculati con batteri o funghi con una concentrazione finale di 1,2 x 10⁸ CFU/mL o virus con una concentrazione maggiore di 1 x 10⁶ TCID₅₀/mL. Nessuno dei seguenti organismi inoculati nei campioni fecali ha interferito con Premier C. difficile GDH:

Aeromonas hydrophila, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Group B, *Salmonella* Group D, *Salmonella* Group E, *Serratia liquifaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Type 40, Adenovirus Type 41, Coxsackievirus Strain B4, Echovirus Strain 11, Rotavirus Strain WA

Campioni inoculati con *Staphylococcus aureus* (ceppo Cowan I) e *Clostridium sporigenes* sono stati trovati essere cross-reattivi con il Premier C. difficile GDH.

SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica del test Premier C. difficile GDH è di 8 ng/mL (antigene inoculato nelle feci).

REATTIVITÀ DEL TEST

Le seguenti colture di C. difficile provenienti da fonti diverse sono state analizzate e hanno prodotto risultati positivi a 5,7 x 10⁷ CFU/mL con Premier C. difficile GDH. Ceppi C.difficile tossigenici 8864, 10463, 43598, 2004052, 2004111, 2004118, 2004205, 2004206, 2005070, 2005257, 2005325, 2006240, 2007431, 2007435, 2007858, 2008016, 2008029, 2008162, 2008188, 2008341, 2008351, 2009018, 2009065, 2009066, 2009099, 2009132, 2009155, 2009277, B1, B117, B18, BK6, CF1, G1, J7, K12, Y1

Ceppi C.difficile non-tossigenici 11186, 234, 586, 611, 620, 2C62, 2C165, C122, UNC19904, X15076

ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

Le seguenti sostanze, alle concentrazioni solvente/diluente sature indicate, non interferiscono con i risultati del test alle concentrazioni finali indicate nella lista: Solfato di barrio a 5 mg/mL, Acido stearico/acido palmitico (grasso fecale) a 2.65mg/mL/1.3 mg/mL, Emoglobina a 3.2 mg/mL, Imodium AD® (Loperamide HCl) a 6.67x10⁻³ mg/mL, Kaopectate® (Bismuto salicilato) a 0.87 mg/mL, Metronidazolo a 12.5 mg/mL, Mucina a 3.33 mg/mL, Mylanta® (ammonio idrossido/magnesio idrossido) a 4.2 mg/mL, Pepto Bismol® (Bismuto salicilato) a 0.87 mg/mL, Polietilen glicole 3350 a 79.05 mg/mL, Prilosec® (Omeprazolo) a 0.5 mg/mL, Simeticone a 0.625 mg/mL, Tagamet® (Cimetidina) a 0.5 mg/mL, Tums® (Calcio carbonato) a 0.5 mg/mL, Vancomicina idroclorito a 2.5 mg/mL, Globuli bianchi a 5%, Sangue intero al 25%

premier®

C. difficile GDH

Immunodosage enzymatique pour la détection de la
GDH de *Clostridium difficile* dans les échantillons de selles

REF 611096

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Le coffret Premier C. difficile GDH est un immunodosage enzymatique qualitatif pour le dépistage de l'antigène du *Clostridium difficile*, le glutamate déshydrogénase, dans les selles de patients symptomatiques pour lesquels une infection au C. difficile (ICD) est suspectée. Le test ne fait pas de distinction entre les souches toxigènes ou non-toxigènes du C. difficile. Les échantillons provenant de patients symptomatiques produisant des résultats positifs avec ce test doivent encore être testés avec un test conçu pour la détection de souches C. difficile toxigènes afin d'aider au diagnostic de la CDI.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Clostridium difficile est devenu l'agent étiologique le plus important parmi les diarrhées nosocomiales survenant dans le monde. L'infection par C. difficile (ICD) peut aller d'une diarrhée bénigne à un syndrome colectasique mettant en jeu le pronostic vital. Les facteurs de risque classiques de l'ICD incluent l'utilisation d'antibiotiques et le vieillissement. Cependant, l'ICD a récemment été observée de façon plus fréquente en dehors de l'environnement hospitalier sans les facteurs de risque typiques historiquement associés avec l'infection par C. difficile.¹ C. difficile produit deux toxines (les toxines A et B), toutes les deux associées aux maladies causées par C. difficile. Les souches de C. difficile qui n'hébergent pas les gènes des toxines A et B sont considérées comme non pathogènes. Toutes les souches de C. difficile produisent de la glutamate déshydrogénase (GDH), aussi connue sous le nom d'antigène commun.^{2,3} Les démarches non moléculaires des laboratoires pour détecter C. difficile peuvent se répartir en deux groupes principaux selon qu'elles utilisent des toxines ou non. Les dosages utilisant les toxines incluent l'immunodosage enzymatique (EIA) pour la toxine A ou les toxines A et B et la cytotoxine, ce dosage détectant essentiellement la toxine B. Les tests de détection de *Clostridium difficile*, tel qu'un EIA pour l'enzyme spécifique GDH, bien qu'intrinsèquement plus sensible, doivent être suivis d'un test pour la détermination de la toxigénicité du *Clostridium difficile*.

PRINCIPE DU TEST

Le coffret Premier C. difficile GDH est un immunodosage enzymatique qualitatif pour le dépistage de l'antigène du *Clostridium difficile*, le glutamate déshydrogénase, dans les selles de patients symptomatiques pour lesquels une infection au C. difficile (ICD) est suspectée. Les micropuits détachables sont recouverts d'anticorps de lapin anti-GDH. L'échantillon dilué du patient et la peroxydase de raifort conjuguée à un anticorps anti-GDH sont ajoutés aux micropuits, puis incubés. Une fois l'incubation terminée, une étape de lavage est effectuée pour éliminer les matières non liées. Si la GDH de C. difficile est présente, un complexe anticorps-enzyme se forme. Un substrat chromogène est ajouté aux micropuits, puis incubé. En présence de l'enzyme lié, une couleur bleue se développe. Une solution d'arrêt est alors ajoutée; elle fait virer la réaction initiale du bleu au jaune. Les résultats du test sont interprétés par spectrophotométrie.

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

1. **Micropuits Premier C. difficile GDH:** micropuits recouverts d'anticorps polyclonaux. Les anticorps sont spécifiques de la GDH de C. difficile.
2. **Conjugué Enzymatique Premier C. difficile GDH:** anticorps polyclonaux conjugués à la HRP spécifiques de la GDH de C. difficile dans une solution protéinique tamponnée contenant 0,1 % de ProClin® et 0,03 % de gentamicine comme conservateurs.
3. **Tampon de Lavage II 20X:** tampon de lavage concentré contenant 0,2 % de thimérosal comme conservateur. A diluer avant emploi.
4. **Substrat I:** solution tamponnée contenant du peroxyde d'urée et de la tétraméthylbenzidine, pH 5
5. **Solution d'arrêt I:** 1M d'acide phosphorique.
6. **Diluant pour Echantillon / Contrôle Négatif de Premier C. difficile GDH:** solution protéinique tamponnée contenant 0,1 % de ProClin® et 0,03% de gentamicine comme conservateurs.
7. **Contrôle Positif Premier C. difficile GDH:** GDH de C. difficile dans une solution protéinique tamponnée contenant 0,1% de ProClin® et 0,03 % de gentamicine comme conservateurs.
8. Pipettes de transfert
9. Support pour barrette de micropuits
10. Film adhésif pour microplaque

MATERIEL NON FOURNI

1. Gants jetables en latex
2. Tubes pour test (p. ex. 10 x 75 mm ou 12 x 75 mm) pour la dilution de l'échantillon
3. Eau distillée ou déionisée
4. Pissette
5. Epruvette graduée pour préparer la solution de lavage 1X
6. Papier absorbant
7. Poubelle avec désinfectant et / ou sacs autoclavables pour déchets dangereux
8. Mélangeur vortex
9. Minuteur
10. Lecteur pour microplaque EIA capable de lire une absorbance à 450 nm ou 450 / 630 nm*
11. Incubateur / agitateur StatFax™ -2200 (StatFax™ est une marque de commerce de Awareness Technology, Inc.)* (optionnel)*
12. Laveur semi-automatique pour microplaque* (optionnel)*

* REMARQUE: Il est de la responsabilité de l'opérateur de valider le StatFax™, les laveurs de microplaque et lecteurs avant utilisation de ces appareils avec ce produit.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Ne pas interchanger les micropuits, le Conjugué Enzymatique, le Substrat I ou les réactifs de Contrôle Positif entre les lots. (Le Diluant pour Echantillon / Contrôle Négatif, le Tampon de Lavage II 20X et la Solution d'arrêt I sont interchangeables du moment que la date de péremption des réactifs n'a pas expiré).
3. Ne pas utiliser les éléments du coffret si la date de péremption indiquée est dépassée.
4. Ne pas utiliser les flacons qui n'ont pas d'étiquette, de numéro de lot ou de date de péremption.
5. Ne pas utiliser les réactifs s'ils ont changé de couleur ou sont troubles. La décoloration ou la turbidité peut être un signe de contamination microbienne.
6. Laisser les réactifs atteindre 21–27 °C avant utilisation.
7. Tous les réactifs doivent être mélangés doucement avant utilisation.
8. Tenir les flacons de réactif à la verticale, à une distance raisonnable au-dessus du puits, pour assurer une taille des gouttes et une distribution correctes.
9. Remettre les bouchons colorés sur les flacons correspondants.
10. Ne pas réutiliser les micropuits.
11. Les micropuits non utilisés doivent être remis dans la pochette refermable. Il est important de protéger les puits de l'humidité.
12. Les pipettes de transfert fournies doivent être utilisées pour la préparation et le transfert des échantillons. Utiliser une pipette par échantillon.
13. Éviter les éclaboussures lors de la distribution des selles diluées dans les micropuits en plaçant l'extrémité de la pipette à mi-chemin dans le puits et en laissant couler doucement l'échantillon le long de la paroi du puits.
14. Le lavage des micropuits doit être effectué comme indiqué dans la procédure du dosage. **Un lavage incorrect peut entraîner une fluorescence de fond élevée comme dans tout protocole EIA.**
15. Tous les réactifs sont fournis déjà dilués à la concentration correcte sauf le tampon de lavage II 20X.
16. Toute déviation de la durée d'incubation indiquée peut avoir un effet sur la sensibilité et la spécificité et doit être évitée.
17. Les selles doivent être bien mélangées (quelle que soit leur consistance) pour assurer un échantillon représentatif avant le pipetage.

MISES EN GARDE

1. Les échantillons de patients peuvent contenir des agents infectieux; ils doivent être manipulés et éliminés comme s'ils étaient biologiquement dangereux.
2. Jeter la solution de lavage usagée et tout le matériel du test dans un récipient adéquat. Traiter les déchets comme une matière biologique potentiellement dangereuse.
3. Le contrôle positif contient de la GDH de *C. difficile*. Il doit être manipulé comme une matière biologique potentiellement dangereuse.
4. Eviter tout contact cutané avec la solution d'arrêt I; s'il y a contact, rincer immédiatement avec de l'eau.

DANGER ET MISES EN GARDE

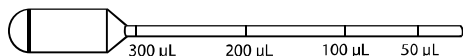
 Premier Stop Solution I	mention d'avertissement Danger mentions de danger H412 - Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme H314 - Provoque des brûlures de la peau et de graves lésions des yeux Conseils de prudence - UE (par 28, 1272/2008) P260 - Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols P264 - Se laver le visage, les mains et toute surface de peau exposée soigneusement après manipulation P280 - Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage. P305 + P351 + P338 - EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer P303 + P361 + P353 - EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/ se doucher. P363 - Laver les vêtements contaminés avant réutilisation P304 + P340 - EN CAS D'INHALATION: transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer P310 - Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin P301 + P330 + P331 - EN CAS D'INGESTION : Rincer la bouche. NE PAS faire vomir P405 - Garder sous clef P501 - Éliminer le contenu/récipient dans une usine d'élimination des déchets homologuée
 Premier C. difficile GDH 20X Wash Buffer II	Mention d'avertissement Danger Mentions de danger H302 - Nocif en cas d'ingestion H311 - Toxique par contact cutané Conseils de prudence - UE (§28, 1272/2008) P280 - Porter des gants de protection/ des vêtements de protection
 Premier C. difficile GDH Sample Diluent / Negative Control Premier C. difficile GDH Enzyme Conjugate Premier C. difficile GDH Positive Control	Mention d'avertissement Danger Mentions de danger H314 - Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves H317 - Peut provoquer une allergie cutanée H319 - Provoque une sévère irritation des yeux Contient Mixture, 3(2H)-isothiazolone, 5-chloro-2-methyl- with 2-methyl-3(2H)-isothiazolone Conseils de prudence - UE (§28, 1272/2008) P280 - Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage P260 - Ne pas respirer les poussières ou brouillards P305 + P351 + P338 - EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer P310 - Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin P303 + P361 + P353 - EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/ se doucher P280 - Porter un équipement de protection des yeux/ du visage

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date de péremption du coffret est indiquée sur l'étiquette du coffret. Conserver le coffret entre 2 et 8 C et le remettre au plus vite au réfrigérateur après chaque utilisation.

REMARQUES SUR LA PROCEDURE

Ci-dessous, un schéma de la pipette de transfert Premier C. difficile GDH.



PREPARATION DES REACTIFS

1. Amener tout le coffret, y compris la pochette de micropuits, à une température comprise entre 21 et 27 C avant l'utilisation.
2. Préparer la solution de lavage 1X selon le besoin. Par exemple: 10,0 mL de tampon de lavage II 20X + 190,0 mL d'eau distillée ou déionisée sont suffisants pour laver une barrette. La solution de lavage 1X peut être conservée entre 21 et 27 C pendant trois mois.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Echantillons de selles humaines, sans conservateur: les échantillons doivent être reçus dans un récipient de transport étanche et conservés entre 2 et 8 C avant l'analyse. Les échantillons doivent être analysés le plus tôt possible, mais peuvent rester en souffrance pendant cinq jours entre 2 et 8 C (voir la section PREPARATION DES ECHANTILLONS pour les instructions concernant la dilution des échantillons). Les échantillons qui ne seront pas analysés dans les cinq jours doivent être congelés dès réception et conservés congelés à ≤ -20 C jusqu'au moment de l'analyse. Les échantillons peuvent être conservés au congélateur pendant deux mois; ils peuvent être congelés et décongelés deux fois.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

Mélanger l'échantillon de selles aussi complètement que possible avant son prélèvement à la pipette.

1. **Echantillons de selles humaines, sans conservateur:**
 - a. A l'aide du flacon compte-gouttes (ou un équivalent), ajouter 200 µL de diluant pour échantillon / contrôle négatif à un petit tube pour test.
 - b. **Selles liquides ou semi-solides:**
 - i. A l'aide d'une pipette de transfert fournie avec le coffret, ajouter 50 µL (premier repère à partir de l'extrémité de la pipette) de selles bien mélangées au tube de diluant pour échantillon / contrôle négatif.
 - ii. Passer le mélange au vortex pendant un minimum de 15 secondes.
 - iii. Remettre la pipette dans le tube d'échantillon en vue d'une utilisation ultérieure.
 - c. **Selles diluées dans le diluant pour échantillon:** au besoin, les selles diluées dans le diluant pour échantillon peuvent être maintenues entre 2 et 27 C pendant 24 heures avant d'être analysées du moment que le tube soit fermé.
 - d. Les échantillons de selles peuvent être centrifugés après dilution. Centrifuger à environ 2750 x G pendant 3 minutes ou jusqu'à ce que la matière solide se sépare du liquide. Procéder au dosage après avoir prélevé le surnageant.

PROCEDURE DE TEST

1. Une fois que la pochette a atteint (21-27 C), détacher le nombre requis de micropuits (1 puits pour chaque échantillon, plus 1 puits de contrôle positif et 1 puits de contrôle négatif par série). Placer les micropuits dans le support de puits et relever la position de tous les puits. Les micropuits non utilisés doivent être remis immédiatement dans la pochette refermable.
2. A l'aide de la pipette de transfert, ajouter 100 µL de selles diluées (deuxième repère à partir de l'extrémité de la pipette) au puits approprié; placer l'extrémité de la pipette à mi-chemin dans le puits et laisser l'échantillon couler doucement le long de la paroi du puits.
3. Ajouter 2 gouttes de contrôle positif. A l'aide d'une pipette de transfert, ajouter 100 µL (deuxième repère à partir de l'extrémité de la pipette) de diluant pour échantillon / contrôle négatif aux puits appropriés.
4. Ajouter 1 goutte (environ 50 µL) de conjugué enzymatique à chaque puits. Agiter fermement la plaque pendant 30 secondes.
5. Couper le film adhésif pour plaque à la taille appropriée et l'appliquer fermement sur le dessus des micropuits pour les sceller. Incuber la plaque pendant 50 minutes entre 35 et 39 C. **Les laboratoires équipés d'un agitateur de plaques chauffant (StatFax 2200™) peuvent aussi incuber et faire tourner la plaque pendant 20 minutes à 37 C à 1000 tpm (réglage n° 5).**
6. Avec précaution, retirer le film adhésif de la plaque et procéder au lavage des puits :
 - a. **Méthode manuelle:**
 - i. Eliminer d'un geste ferme le contenu de la plaque dans un récipient pour déchets biologiques dangereux.
 - ii. Retourner la plaque et la taper sur du papier absorbant propre.
 - iii. Remplir complètement les puits avec la solution de lavage 1X en dirigeant le jet de la solution contre les parois des puits pour éviter la formation de mousse.
 - iv. Répéter le cycle de lavage (vider, taper sur du papier propre, remplir) 4 à 6 fois de plus pour un total de 5 à 7 lavages. Après le dernier remplissage, vider et taper la plaque suffisamment fort (sur du papier absorbant propre) pour éliminer autant d'excès de solution de lavage que possible mais sans que les puits ne sèchent complètement à aucun moment.
 - b. **Méthode de lavage semi-automatique:**
 - i. Eliminer d'un geste ferme le contenu de la plaque dans un récipient pour déchets biologiques dangereux.
 - ii. Retourner la plaque et la taper sur du papier absorbant propre, ensuite placer la plaque vide sur l'appareil de lavage.
 - iii. Remplir les puits jusqu'au bord (environ 300-350 µL/puits) de solution de lavage 1X, puis aspirer. Le collecteur du laveur doit être ajusté de façon qu'aucune formation de mousse ne survienne pendant le remplissage des puits et que les puits soient bien aspirés après chaque lavage.
 - iv. Répéter l'étape iii 4 fois de plus. Après le dernier lavage, aspirer soigneusement les puits de test pour enlever autant que possible d'humidité, cependant s'assurer que les puits ne sèchent complètement à aucun moment.
7. Ajouter 2 gouttes (environ 100 µL) de Substrat I à chaque puits. Agiter fermement la plaque pendant 30 secondes. Incuber la plaque pendant 10 minutes entre 21 et 27 C.
8. Ajouter 2 gouttes (environ 100 µL) de Solution d'arrêt I à chaque puits. Bien homogénéiser la plaque par mouvement circulaire pendant 30 secondes. **Remarque:** la couleur initiale d'une réaction positive est bleue, elle tourne au jaune lors de l'ajout de la Solution d'arrêt I.
9. Nettoyer le dessous des puits à l'aide d'un tissu non pelucheux.
10. Observer et noter les réactions. Les résultats du test doivent être lus à l'aide d'un spectrophotomètre. Faire une mise à zéro du lecteur sur l'air. Lire l'absorbance à 450 nm ou 450 / 630 nm dans les 30 minutes suivant l'ajout de la Solution d'arrêt I.
11. Suspecter un appareillage défectueux ou une méthode de lavage insuffisante lorsque les contrôles négatif et/ou positif produisent, à chaque fois, des résultats hors-spécifications. Pour corriger le problème, augmenter le nombre de cycles de lavage, ainsi que la vigueur des lavages, décanter de manière plus rigoureuse ou re-calibrer l'appareillage. Si toutefois le problème persiste, contacter les Services de Support Techniques de Meridian ou son distributeur agréé pour assistance.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Spectrophotomètre, simple longueur d'onde (450 nm)

Négatif:	< 0,200
Positif:	≥ 0,200
Contrôle négatif:	< 0,150
Contrôle positif:	≥ 0,600

Spectrophotomètre, double longueur d'onde (450/630 nm)

Négatif:	< 0,150
Positif:	≥ 0,150
Contrôle négatif:	< 0,100
Contrôle positif:	≥ 0,600

Si le contrôle négatif est < 0, refaire le zéro du lecteur de plaque sur l'air et relire la microplaque.

Un résultat positif indique la présence de GDH de *C. difficile*. Un résultat négatif indique l'absence de GDH de *C. difficile* ou bien que le niveau de la GDH de *C. difficile* est inférieur au seuil de détection du test. La grandeur de la DO, au-dessus de la valeur seuil, n'indique en rien la sévérité ou l'étendue de l'infection par *C. difficile*, ni ne peut être reliée à un titre déterminé. Une réaction positive extrêmement forte peut entraîner soit un précipité de couleur jaune intense soit violet dans les minutes qui suivent l'arrêt de la réaction. Dans ce cas, le spectrophotomètre peut indiquer une lecture « hors plage ». Cette lecture doit être considérée comme un résultat positif.

Si la fréquence des résultats positifs faibles (DO entre 0,200 et 0,250 pour la longueur d'onde simple et entre 0,150 et 0,200 pour la double) est supérieure à 5 % des échantillons analysés, cela peut indiquer un lavage insuffisant. Il est alors recommandé de mieux laver ou d'augmenter les lavages à sept à l'étape 6 de la procédure.

CONTROLE DE LA QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

1. A chaque utilisation, les éléments du coffret doivent être examinés visuellement pour repérer tout signe évident de contamination microbienne, congélation ou fuite. Ne pas utiliser des réactifs contaminés ou suspects.
2. La performance du test Premier *C. difficile* GDH doit être vérifiée en utilisant le contrôle positif et le diluant pour échantillon / contrôle négatif pour chaque lot de test. Voir la section INTERPRETATION DES RESULTATS ci-dessus pour une description des résultats attendus pour les réactifs de contrôle. Les tests doivent être considérés non valides lorsqu'un l'un ou l'autre des réactifs de contrôle ne donne pas le résultat escompté. Dans ces cas-là, répéter les tests et les contrôles. Si, après avoir refait le test, les réactions attendues ne sont toujours pas observées et que la date de péremption des réactifs n'est pas dépassée, contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou de son distributeur agréé.
3. Les contrôles sont utilisés pour détecter d'éventuels défauts des réactifs. Le fait de ne pas obtenir les résultats attendus indique que l'un ou l'autre réactif est défectueux au moment de l'utilisation, que le test n'a pas été effectué correctement, ou que les réactifs ou échantillons n'ont pas été ajoutés. **Si les réactions attendues ne sont pas observées, la première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests des contrôles. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.**
4. Aucune interférence de la matrice de l'échantillon n'a été observée, la dilution des échantillons étant élevée dans ce test. Aussi, les réactifs de contrôle fournis sont préparés dans la matrice du diluant échantillons. Au cas où des contrôles identiques aux échantillons testés, en termes de composition, sont préférés, l'utilisateur est invité à les préparer en diluant des échantillons positifs et négatifs connus dans le diluant échantillons suivant la procédure décrite sous la rubrique PREPARATION DES ECHANTILLONS. Ajouter 100 µL des contrôles ainsi préparés dans les puits.

VALEURS ATTENDUES

La fréquence des diarrhées associées à la prise d'antibiotiques, causées par *C. difficile* dépend de plusieurs facteurs tels que: la population de patient, le type d'établissement et l'épidémiologie. L'incidence de l'infection à *C. difficile* rapportée chez les patients suspectés d'avoir une diarrhée associée à la prise d'antibiotiques est de 15 à 25%⁴ bien que certains établissements pourront obtenir des taux de positivité en dehors de cette plage.

LIMITES DE LA PROCEDURE

1. Exclusivement pour diagnostic in vitro.
2. Le test est une technique qualitative et aucune interprétation quantitative ne peut être faite en ce qui concerne les valeurs.
3. Un résultat positif ne définit pas l'existence de l'infection à *C. difficile* ou la présence du *C. difficile* toxigène, il indique seulement la détection de l'organisme. Toutes les selles qui sont positives avec le test Premier *C. difficile* GDH doivent être testées pour rechercher les toxines afin de vérifier la présence du *C. difficile* toxigène.
4. Une incubation trop longue des tests peut produire une augmentation de faux positifs. Réciproquement, des périodes d'incubation inférieures à celles définies dans cette notice peuvent entraîner une augmentation de faux négatifs. Il faut respecter les périodes d'incubation définies dans cette notice.
5. *Staphylococcus aureus* (souche Cowan I) et *Clostridium sporogenes* réagissent de façon croisée avec le test Premier *C. difficile* GDH.
6. Ce test est destiné à être utilisé sur des selles non-formées seulement. Les performances du test ne sont pas établies sur d'autres types d'échantillon clinique.

PERFORMANCES SPECIFIQUES

Le test Premier C. difficile GDH a été évalué par cinq sites indépendants situés dans le Sud-Ouest, le Sud-Est et les régions du Midwest des Etats-Unis. Un total de 733 échantillons de patients qualifiés ont été évalués; tous les échantillons ont été collectés de manière prospective. Les échantillons ont été recueillis auprès d'hommes (46 %) et de femmes (53 %). Dans 1 % des patients, le sexe n'était pas connu. Les groupes d'âge des patients variait de 22 jours à 99 ans. Aucune différence dans les performances du test n'a été observée selon l'âge ou le sexe des patients. Les tableaux suivants montrent la performance du test par site clinique et par âge du patient.

Table 1. Performances du test par site clinique

Site	Echantillons Positifs			Echantillons Négatifs		
	Premier GDH/ Culture	Sensibilité%	95 % IC	Premier GDH/ Culture	Spécificité %	95 % IC
Total	108/117	92,3 %	86,0 – 95,9 %	590/616	95,8 %	93,9 – 97,1 %
Site 1	13/16	81,3 %	57,0 – 93,4 %	84/87	96,6 %	90,3 – 98,8 %
Site 2	28/30	93,3 %	78,7 – 98,2 %	132/140	94,3 %	89,1 – 97,1 %
Site 3	44/46	95,7 %	85,5 – 98,8 %	147/153	96,1 %	91,7 – 98,2 %
Site 4	15/15	100,0 %	79,6 – 100,0 %	169/175	96,6 %	92,7 – 98,4 %
Site 5	8/10	80,0 %	49,0 – 94,3 %	58/61	95,1 %	86,5 – 98,4 %

- Les échantillons discordants ont été évalués avec un autre test ELISA, approuvé par la FDA pour la détection de C. difficile GDH.
- Seize des 26 échantillons faussement positifs étaient positifs avec un autre test GDH approuvé FDA.
- Huit des neuf échantillons faussement négatifs étaient négatifs avec un autre test GDH approuvé FDA.

Table 2. Performances du coffret par tranche d'âge

Age du patient	Echantillons positifs			Echantillons négatifs		
	Premier GDH/ Culture	Sensibilité %	95 % IC	Premier GDH/ Culture	Spécificité %	95 % IC
De 0 à 28 jours	0/0	N/A	N/A	1/1	100,0 %	20,7 – 100,0 %
De 29 jours à 2 ans	22/24	91,7 %	74,2 – 97,7 %	56/60	93,3 %	84,1 – 97,4 %
De 2 ans à 12 ans	24/25	96,0 %	80,5 – 99,3 %	106/109	97,2 %	92,2 – 99,1 %
De 12 ans à 18 ans	9/11	81,8 %	52,3 – 94,9 %	59/61	96,7 %	88,8 – 99,1 %
De 18 ans à 21 ans	3/4	75,0 %	30,1 – 95,4 %	22/23	95,7 %	79,0 – 99,2 %
21 ans et plus	50/53	94,3 %	84,6 – 98,1 %	345/361	95,6 %	92,9 – 97,3 %
Non défini	0/0	N/A	N/A	1/1	100,0 %	20,7 – 100,0 %

REPRODUCTIBILITE

La précision du test, les variabilités intra- et inter-essai ont été déterminées en testant un panel de référence préparé à partir de mélanges d'échantillons négatifs ensemencés par l'antigène GDH de C. difficile. Le panel de reproductibilité comprend des échantillons modérément positifs (n=3), des échantillons positifs bas (n=3), des échantillons négatifs élevés (n=3) et un négatif (n=1). Les positifs bas et les négatifs élevés ont été préparés à des concentrations proches de la limite de sensibilité du test. Chaque échantillon a été évalué deux fois par jour pendant cinq jours par trois laboratoires différents. La reproductibilité était de 100%; aucune variabilité intra- et inter-essai n'a été observée pour les échantillons préparés au-dessus ou en-dessous de la limite de sensibilité analytique du test.

ETUDES DE REACTION CROISEE

Des études de réaction croisée ont été effectuées avec des échantillons de selles positifs et négatifs inoculés avec des organismes bactériens ou fongiques pour obtenir une concentration finale de 1,2 x 10⁸ UFC/mL ou virale supérieure à 1 x 10⁵ DICT₅₀/mL. Aucun des organismes suivants, présents dans les selles, n'a réagi avec le test Premier C. difficile GDH: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Groupe B, *Salmonella* Groupe C, *Salmonella* Groupe D, *Salmonella* Groupe E, *Serratia liquifaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Type 40, Adenovirus Type 41, Coxsackievirus Souche B4, Echovirus Souche 11, Rotavirus Souche WA

Il a été observé que les selles inoculées avec le *Staphylococcus aureus* (souche Cowan I) et le *Clostridium sporogenes*, réagissent de façon croisée avec le test Premier C. difficile GDH.

SENSIBILITE ANALYTIQUE

La sensibilité analytique du test Premier C. difficile GDH est de 8 ng/mL sur des selles inoculées.

REACTIVITE DU DOSAGE

Les souchothèques de C. difficile suivantes, provenant de différentes sources, ont été testées et ont produit des réactions positives à une concentration de 5,7 x 10⁷ UFC/mL avec le test Premier C. difficile GDH.

Souches C. difficile toxigènes 8864, 10463, 43598, 2004052, 2004111, 2004118, 2004205, 2004206, 2005070, 2005257, 2005325, 2006240, 2007431, 2007435, 2007858, 2008016, 2008029, 2008162, 2008188, 2008341, 2008351, 2009018, 2009065, 2009066, 2009099, 2009132, 2009155, 2009277, B1, B17, B18, BK6, CF1, G1, J7, K12, Y1

Souches C. difficile non-toxigènes 11186, 234, 586, 611, 620, 2C62, 2C165, C122, UNC19904, X15076

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Les substances suivantes, aux concentrations spécifiées saturées du solvant / diluant, n'interfèrent pas avec les résultats du test aux concentrations finales listées:

Sulfate de baryum à 5 mg/mL, Acide stéarique/acide palmitique (graisses fécales) à 2,65mg/mL/1,3 mg/mL, Hémoglobine à 3,2 mg/mL, Imodium AD® (Chlorhydrate de Lopéramide) à 6,67x10⁻³ mg/mL, Kaopectate® (Subsalicylate de Bismuth) à 0,87 mg/mL, Metronidazole à 12,5 mg/mL, Mucine à 3,33 mg/mL, Mylanta® (Hydroxyde d'ammonium sans hydroxyde de magnésium) à 4,2 mg/mL, Pepto Bismol® (Subsalicylate de Bismuth) à 0,87 mg/mL, Polyéthylène glycol 3350 à 79,05 mg/mL, Prilosec® à 0,5 mg/mL (Oméprazole), Simethicone à 0,625 mg/mL, Tagamet® (Cimétidine) à 0,5 mg/mL, Tums® (Carbonate de calcium) à 0,5 mg/mL, Hydrochlorure de vancomycine à 2,5 mg/mL, Globules blancs à 5%, Sang total à 25%

premier®

C. difficile GDH

Inmunoensayo enzimático para la detección de
GDH del *Clostridium difficile* en muestras de materia fecal

REF 611096

IVD

Rx Only

USO INDICADO

La prueba Premier C. *difficile* GDH es un inmunoensayo enzimático cualitativo para la detección precoz del antígeno glutamato deshidrogenasa (GDH) de *Clostridium difficile* en muestras de materia fecal de pacientes sintomáticos que se sospechan tener infección de C. *difficile* (ICD). La prueba no distingue entre cepas toxigénicas y no-toxigénicas de C. *difficile*. Muestras de pacientes sintomáticos que producen resultados positivos con esta prueba deben ser confirmados usando un ensayo diseñado para detectar las cepas toxigénicas de C. *difficile* y que ayude al diagnóstico de CDI.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El *Clostridium difficile* se ha convertido en el agente etiológico más importante de la diarrea intrahospitalaria, a nivel mundial. La infección por C. *difficile* (ICD) puede causar desde diarrea leve hasta megacolon tóxico potencialmente mortal. Los factores de riesgo clásicos para la ICD intrahospitalaria son, entre otros, el uso de antibióticos y la edad avanzada. Sin embargo, recientemente, la ICD se ha observado con más frecuencia fuera del entorno hospitalario sin los factores de riesgo típicos que históricamente se han asociado con la infección por C. *difficile*.¹ El C. *difficile* produce dos toxinas, toxina A y toxina B, y ambas se han asociado con la enfermedad producida por el C. *difficile*. Las cepas de C. *difficile* que no contienen los genes de la toxina A ni de la toxina B no se consideran patógenas. Todas las cepas de C. *difficile* producen Glutamato deshidrogenasa (GDH), la cual también se conoce como antígeno común.^{2,3} Las pruebas de laboratorio que no se basan en técnicas moleculares para la detección de C. *difficile* se pueden dividir en dos grupos principales: las que se basan en la detección de toxinas y las que no se basan en la detección de toxinas. Entre las pruebas que se basan en la detección de toxinas se encuentra la prueba de inmunoensayo enzimático (EIA en inglés) para la toxina A o para las toxinas A y B y citotoxina, la cual detecta principalmente la toxina B. Ensayos no basados en toxinas, como ELISA para C. *difficile* GDH aunque tienden a ser más sensibles, deben ser seguidos por pruebas para C. *difficile* toxigénicas.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

La prueba Premier C. *difficile* GDH es un inmunoensayo enzimático cualitativo para la detección precoz de el antígeno GDH de C. *difficile* en muestras de materia fecal de pacientes sintomáticos que se sospechan tener infección de C. *difficile* (ICD). Los micropocillos desprendibles están recubiertos con anticuerpos anti-GDH de conejo. La muestra de paciente diluida y el conjugado constituido por peroxidasa de rábano – anti-glutamato deshidrogenasa se añaden dentro de los micropocillos y luego se incuban. Una vez finalizada la incubación, se realiza un paso de lavado para remover el material no ligado. Si hay GDH de C. *difficile* presente se forma un complejo anticuerpo-enzima. Se añade un sustrato cromógeno a los micropocillos y se incuban. En presencia de la enzima ligada aparece un color azul. La Solución de parada (Premier Stop Solution I) se añade lo cual hace que el color azul de la reacción inicial cambie a amarillo. Los resultados de la prueba se interpretan mediante el uso de un espectrofotómetro.

REACTIVOS/MATERIALES SUMINISTRADOS

El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

1. **Micropocillos Premier C. *difficile* GDH:** micropocillos recubiertos con anticuerpo policlonal. Los anticuerpos son específicos contra la GDH de C. *difficile*.
2. **Conjugado enzimático C. *difficile* GDH:** anticuerpos policlonales conjugados con peroxidasa de rábano ("Horseradish peroxidase", HRP) específicos contra la GDH del C. *difficile* en una solución proteica tamponada que contiene ProClin® 0,1 % y gentamicina 0,03 % como agentes conservantes.
3. **Solución tampón de lavado Premier 20X Wash Buffer II:** solución tampón de lavado concentrada que contiene timerosal al 0,2 % como agente conservante. . El Tampón es diluido antes de usarse
4. **Substrato Premier Substrate I:** solución tamponada que contiene peróxido de urea y tetrametilbencidina a un pH de 5,0.
5. **Solución de parada Premier Stop Solution I:** ácido fosfórico 1M.
6. **Diluyente de muestras/Control Negativo Premier C. *difficile* GDH:** solución proteica tamponada que contiene ProClin® 0,1 % y gentamicina 0,03 % como agentes conservantes.
7. **Control Positivo Premier C. *difficile* GDH:** GDH de C. *difficile* en una solución proteica tamponada que contiene ProClin® al 0,1 % y gentamicina al 0,03 % como agentes conservantes.
8. Pipetas de transferencia
9. Soporte para tiras de micropocillos
10. Sello para placas de micropocillos

MATERIALES NO SUMINISTRADOS

1. Guantes de látex desechables
2. Tubos de ensayo (por ejemplo, de 10 x 75 mm o de 12 x 75 mm) para diluir la muestra
3. Agua destilada o desionizada
4. Botella plástica para dispensar el enjuague
5. Probeta graduada para preparar la solución tampón de lavado 1X
6. Papel absorbente
7. Recipiente con desinfectante para material de desecho o bolsas para material biológico nocivo que puedan esterilizarse en autoclave
8. Agitador vortical (Vórtex)
9. Cronómetro de intervalos
10. Espectrofotómetro para leer placas de microvaloración por EIA a una absorbancia de 450 nm o de 450/630 nm
11. Incubadora/Agitadora StatFax™-2200 (StatFax™ es una marca comercial de Awareness Technology, Inc.)* (opcional)*
12. Lavadora semiautomática para placas de microvaloración (opcional)*

*Nota: Es la responsabilidad del operador validar el uso de StatFax™, lavador de plato semi-automatizado y/o lector antes de usarse con este producto.

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
2. No intercambie micropocillos, Conjugado enzimático, sustrato Premier Substrate I ni reactivos de Control Positivo provenientes de distintos lotes. (El Diluyente de muestras/Control Negativo, la solución tampón de lavado Premier 20X Wash Buffer II y la Solución de parada Premier Stop Solution I son intercambiables, siempre y cuando los reactivos se usen antes de la fecha de caducidad asignada).
3. No use componentes del equipo que hayan caducado.
4. No use viales que no tengan etiqueta, número de lote o fecha de caducidad.
5. No use ningún reactivo si éste está decolorado o turbio. La decoloración o turbidez pueden ser una señal de contaminación microbiana.
6. Permita que los reactivos alcancen una temperatura entre 21 y 27 °C antes de usarlos.
7. Todos los reactivos deben mezclarse suavemente antes de usarse.
8. Sostenga los viales de los reactivos verticalmente a una distancia apropiada sobre el micropocillo, para asegurar un tamaño y administración apropiados de la gota.
9. Vuelva a tapar los viales con las tapas del color correspondiente.
10. No vuelva a utilizar los micropocillos.
11. Los micropocillos sin usar deben volver a colocarse dentro de la bolsa re-sellable. Es importante proteger las tiras de la humedad.
12. Las pipetas de transferencia proporcionadas con este kit deben usarse para la preparación y transferencia de la muestra. Use una por cada muestra.
13. Evite salpicar al dispensar dentro de los micropocillos la materia fecal diluida, colocando la punta de la pipeta de transferencia aproximadamente hasta la mitad del micropocillo, y dispensando lentamente por uno de los lados de éste.

14. El lavado de los micropocillos debe realizarse con precisión del modo en que se describe en el procedimiento de la prueba. **Un lavado inadecuado puede ser la causa de que se obtengan lecturas elevadas debido al color de fondo, en cualquier protocolo de EIA.**
15. Todos los reactivos excepto la solución tampón de lavado Premier 20X Wash Buffer II vienen diluidos a la concentración adecuada.
16. Cualquier desviación (aumento o disminución) de los tiempos de incubación especificados puede afectar la sensibilidad y especificidad de la prueba y debe evitarse.
17. Antes de pipetear, la materia fecal debe mezclarse minuciosamente, independientemente de cuál sea su consistencia, para garantizar la obtención de una muestra representativa.

ADVERTENCIAS

1. Las muestras de los pacientes pueden contener agentes infecciosos y deben manejarse y desecharse como si fueran material biológico potencialmente nocivo.
2. Deseche la solución tampón de lavado y todos los materiales de la prueba en un recipiente adecuado para esto. Trate el material de desecho como si éste fuera potencialmente nocivo.
3. El reactivo de Control Positivo contiene GDH de *C. difficile* y debe manejarse como si fuera material biológico nocivo.
4. Evite el contacto de la piel con la Solución de parada Premier Stop Solution I. Si se produce contacto con la piel, enjuague de inmediato con agua en abundancia.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

 Premier Stop Solution I	Palabras de advertencia Peligro Indicaciones de peligro H412 - Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos H314 - Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves Consejos de prudencia - UE (§28, 1272/2008) P260 - No respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol P264 - Lavarse la cara, las manos y las áreas de la piel expuestas concienzudamente tras la manipulación P280 - Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección. P305 + P351 + P338 - EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado P303 + P361 + P353 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse P363 - Lavar las prendas contaminadas antes de volver a usarlas P304 + P340 - EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar P310 - Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico P301 + P330 + P331 - EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagar la boca. NO provocar el vómito P405 - Guardar bajo llave P501 - Eliminar el contenido/el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada
--	---

 Premier <i>C. difficile</i> GDH 20X Wash Buffer II	Palabra de advertencia Peligro Indicaciones de peligro H302 - Nocivo en caso de ingestión H311 - Tóxico en contacto con la piel Consejos de prudencia - UE (§28, 1272/2008) P280 - Llevar guantes de protección/ prendas de protección
---	--

 Premier <i>C. difficile</i> GDH Sample Diluent / Negative Control Premier <i>C. difficile</i> GDH Enzyme Conjugate Premier <i>C. difficile</i> GDH Positive Control	Palabra de advertencia Peligro Indicaciones de peligro H314 - Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel H319 - Provoca irritación ocular grave Contiene Mixture, 3(2H)-isothiazolone, 5-chloro-2-methyl-with 2-methyl-3(2H)-isothiazolone Consejos de prudencia - UE (§28, 1272/2008) P280 - Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección P260 - No respirar los vapores o nieblas P305 + P351 + P338 - EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando P310 - Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico P303 + P361 + P353 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse P280 - Llevar gafas/ máscara de protección
--	---

ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

La fecha de caducidad está indicada en el rótulo del kit. Almacene el kit a una temperatura de entre 2-8 C y póngalo de vuelta rápidamente en el refrigerador después de cada uso.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

A continuación se muestra un diagrama de la pipeta de transferencia que viene con el kit Premier *C. difficile* GDH



PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Haga que todos los reactivos del kit incluso la bolsa con los micropocillos, alcancen una temperatura de 21–27 C antes de usarlos.
2. Prepare la cantidad de Solución tampón de lavado 1X Wash Buffer que sea necesaria. Por ejemplo: 10,0 mL de solución tampón de lavado Premier 20X Wash Buffer II + 190,0 mL de agua desionizada o destilada es suficiente para lavar una tira. La solución tampón de lavado 1X Wash Buffer puede almacenarse a 21–27 C durante un máximo de tres meses.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Muestras de materia fecal humana sin conservar: las muestras deben recibirse en un recipiente de transporte con cierre hermético y almacenarse a una temperatura de 2-8 C antes de analizarse. Las muestras deben analizarse tan pronto como sea posible pero pueden guardarse hasta cinco días a una temperatura de 2–8 C. (Vea la sección PREPARACIÓN DE LA MUESTRA para obtener las instrucciones sobre cómo diluir las muestras). Las muestras que no van a analizarse en un plazo de cinco días deben congelarse inmediatamente se reciben y almacenarse a una temperatura ≤ –20 C hasta que se realice la prueba. Las muestras pueden mantenerse congeladas hasta un máximo de dos meses y pueden congelarse y descongelarse dos veces.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Mezcle la materia fecal con el mayor detenimiento y atención que sea posible antes de pipetearla.

1. Muestras de materia fecal humana sin conservar:

- Con el gotero (o equivalente) añada 200 µL de Diluyente de muestras/Control negativo en un tubo de ensayo pequeño.
- Materia fecal líquida o semi-líquida:**
 - Usando una de las pipetas de transferencia provistas con el kit, añada 50 µL (primera marca a partir de la punta de la pipeta) de materia fecal muy bien mezclada al tubo de ensayo que contiene Diluyente de muestras/Control negativo.
 - Agite la mezcla en un agitador vortical (vórtex) durante un mínimo de 15 segundos.
 - Deje la pipeta de transferencia dentro del tubo de ensayo para poder usarla más tarde.
- Muestra de materia fecal diluida en Diluyente de muestras:** Si es necesario, la materia fecal diluida en Diluyente de muestras puede mantenerse a una temperatura de 2 a 27 °C hasta por un plazo de 24 horas antes de realizar la prueba, siempre y cuando el tubo esté sellado.
- Las muestras de materia fecal pueden centrifugarse después de hacer las diluciones. Centrifugue a una velocidad aproximada de 2750 x G durante 3 minutos o hasta que la materia fecal sólida se separe del líquido. Prosiga con la prueba después de separar el sobrenadante.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Después de que la bolsa haya alcanzado la temperatura ideal (21–27 °C), desprenda el número requerido de micropocillos; 1 micropocillo por cada muestra, más 1 micropocillo para el Control Positivo y 1 para el control negativo para cada corrida de la prueba. Coloque los micropocillos en el soporte para tiras de micropocillos y registre la posición de cada muestra. Los micropocillos que no se usen deben guardarse inmediatamente en la bolsa y ésta debe sellarse nuevamente.
- Usando la pipeta de transferencia de la muestra, añada 100 µL de muestra de materia fecal diluida (segunda marca a partir de la punta de la pipeta) dentro del micropocillo adecuado. (Coloque la punta de la pipeta hasta la mitad del micropocillo y deje que la muestra fluya lentamente por uno de los lados de éste).
- Añada 2 gotas de Control Positivo dejándolas caer libremente. Con una pipeta de transferencia, añada 100 µL (segunda marca a partir de la punta de la pipeta) de Diluyente de muestras/Control negativo dentro de los micropocillos adecuados.
- Añada 1 gota (aproximadamente 50 µL) de Conjugado Enzimático dejándola caer libremente sobre cada micropocillo. Mezcle con firmeza el contenido agitando suavemente o con movimientos circulares sobre la mesa de trabajo durante 30 segundos.
- Corte el sello para las placas del tamaño adecuado y colóquelo con firmeza sobre los micropocillos a fin de sellarlos. Incube la placa durante 50 minutos a 35-39 °C. **De otro modo, los laboratorios que están equipados con un agitador/incubador (StatFax 2200™) pueden incubar y rotar la placa durante 20 minutos a 37 °C usando el ajuste 5 (1000 rpm).**
- Cuidadosamente retire el sello de la placa y lave los pocillos:
 - Método manual:**
 - Vuelque con firmeza el contenido de los micropocillos dentro de un recipiente para desechos biológicos nocivos.
 - Golpee con firmeza la placa invertida sobre varias toallas de papel absorbente.
 - Llene todos los micropocillos con Solución Tampón de Lavado 1X Wash Buffer dirigiendo el chorro de solución hacia los lados de los micropocillos para evitar la formación de espuma.
 - Repita el ciclo de lavado (volcar el contenido, golpear con firmeza sobre toallas de papel y llenar) 4 a 6 veces más para completar un total de 5 a 7 ciclos de lavado. Después del último llenado, vuelque y golpee con firmeza la placa sobre toallas absorbentes de papel nuevas, con fuerza suficiente para remover tanta solución tampón de lavado en exceso como sea posible, pero no permita en ningún momento que los micropocillos se sequen por completo.
 - Método de lavado semiautomático:**
 - Vuelque con firmeza el contenido de los micropocillos dentro de un recipiente para desechos biológicos nocivos.
 - Invierta y golpee la placa sobre varias toallas de papel absorbente, luego coloque la placa con los micropocillos desocupados en el dispositivo de lavado.
 - Llene los micropocillos por completo (aproximadamente 300-350 µL/pocillo) con Solución Tampón de Lavado 1X Wash Buffer y luego aspire. El brazo de la lavadora para placas de microvaloración debe ajustarse de modo tal que no se produzca formación de espuma durante el llenado de los micropocillos y que los micropocillos sean aspirados por completo después de cada lavado.
 - Repita el paso iii 4 veces más. Enseguida del último lavado los micropocillos de prueba deben aspirarse minuciosamente a fin de remover tanta humedad como sea posible, pero no deje que los micropocillos se sequen por completo en ningún momento.
- Añada dos gotas (aproximadamente 100 µL) de solución de sustrato Premier Substrate I dejándolas caer libremente dentro de cada pocillo. Agite con firmeza o con movimientos circulares sobre la mesa de trabajo durante 30 segundos. Incube la placa durante 10 minutos a 21–27 °C.
- Añada dos gotas (aproximadamente 100 µL) de Solución de parada Premier Stop Solution I dejándolas caer libremente dentro de cada micropocillo. Agite con firmeza o con movimientos circulares sobre la mesa de trabajo durante 30 segundos. **Nota:** el color inicial de una reacción positiva es azul, el cual cambia a amarillo al añadir la Solución de parada Premier Stop Solution I.
- Limpie la parte inferior de los micropocillos con un papel tisú que no suelte pelusas.
- Observe y registre las reacciones. Los resultados de la prueba se deben leer con un espectrofotómetro. El blanco (absorbancia cero) se obtiene con un pocillo vacío. Lea la absorbancia a 450 nm o a 450/630 nm dentro de un plazo de 30 minutos después de añadir la Solución de parada Premier Stop Solution I.
- Sospeche faya del método de lavado o del pocillo si el Control Negativo y/o Positivo da resultados fuera de especificación consistentemente. Aumentar el número de lavados, lavar mas vigorosamente, decantar completamente o recalibrar el lavador automático debe corregir el problema. Si el problema persiste contacte Servicios Técnicos de Meridian al 800-343-3858 (USA) o contacte su distribuidor local para asistencia.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Longitud de onda única en el espectrofotómetro: 450 nm

Negativo:	< 0,200
Positivo:	≥ 0,200
Control negativo:	< 0,150
Control positivo:	≥ 0,600

Longitud de onda dual en el espectrofotómetro: 450/630 nm

Negativo:	< 0,150
Positivo:	≥ 0,150
Control negativo:	< 0,100
Control positivo:	≥ 0,600

Si al leer un Control negativo el resultado es < 0,000 vuelva a llevar a cero el espectrofotómetro con el blanco de aire y lea de nuevo la placa.

Un resultado positivo indica la presencia de GDH del *C. difficile*. Un resultado negativo indica la ausencia de GDH del *C. difficile* o que el nivel de GDH está por debajo del límite de detección de la prueba. La magnitud de la DO por encima del punto de corte no se relaciona con la gravedad ni con la extensión de la infección por *C. difficile*, ni se puede correlacionar con un título final. Las muestras con resultados altamente positivos pueden generar ya sea un color amarillo intenso o un precipitado de color morado a los pocos minutos de haber parado la reacción. En este caso, el espectrofotómetro puede generar una lectura que está por fuera de los límites de detección. Esta lectura se considera positiva.

Si la frecuencia de resultados positivos bajos (DO entre 0,200 y 0,250 con longitud de onda única, y entre 0,150 y 0,200 con longitud de onda dual) es superior al 5 % de las muestras analizadas esto puede ser indicio de lavado insuficiente. Se recomienda un lavado más vigoroso o aumentar el número de lavados a siete en el paso 6 del procedimiento.

CONTROL DE CALIDAD

Esta ensayo debe ser realizado las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

- Los componentes de cada kit deben examinarse a simple vista para determinar la presencia de señales obvias de contaminación microbiana, congelamiento o derrame cada vez que van a usarse. No use reactivos contaminados o que se sospeche que lo están.
- El funcionamiento de la prueba Premier *C. difficile* GDH debe verificarse usando el Control positivo y el Diluyente de muestras/Control negativo en cada corrida de la prueba. Ver la sección anterior de INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS donde se describen los resultados esperados para los reactivos de control. Las pruebas deben considerarse inválidas cuando cualquiera de los reactivos de control no produce los resultados esperados. En tales casos, vuelva a analizar todas las muestras y los controles. Si después de repetir la prueba aún no se observan los resultados esperados con reactivos que no han caducado, llame a Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) a su distribuidor autorizado de Meridian para obtener ayuda.
- Los controles se usan para monitorizar la reactividad de los reactivos. Cuando los controles no generan los resultados esperados esto puede significar que uno o más de los reactivos ha perdido su reactividad en el momento de usarse, que la prueba no se realizó correctamente o que los reactivos o las muestras no fueron añadidos. **Si los resultados esperados para el control no son observados, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.**

4. En esta prueba no se ha observado interferencia con la matriz de la muestra puesto que antes de realizar la prueba las muestras están lo suficientemente diluidas en Diluyente de muestras. Por este motivo, los controles positivo y negativo que se suministran como parte de esta prueba se preparan en matrices similares al Diluyente de muestras. Si se prefieren materiales de control cuya composición sea idéntica a la de las muestras a ser analizadas, el usuario los puede preparar diluyendo muestras que tengan un resultado positivo y negativo conocidos con Diluyente pardea muestras de acuerdo con la descripción hecha en la sección de PREPARACIÓN DE LA MUESTRA de este prospecto. Añada 100 de controles preparados por el usuario a los pocillos correspondientes de la prueba.

VALORES ESPERADOS

La frecuencia con que el *C. difficile* causa diarrea asociada al uso de antibióticos depende de varios factores entre los cuales están: la población de pacientes, el tipo de institución y la epidemiología. La incidencia que se ha reportado de enfermedad asociada con infecciones de *C. difficile* en pacientes en los cuales se sospecha diarrea asociada al uso de antibióticos es de un 15 a un 25 %⁴ sin embargo, las tasas de positividad entre instalaciones distintas pueden caer fuera de este rango.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Sólo para uso diagnóstico in vitro.
- La prueba es cualitativa y no debe hacerse ninguna interpretación cuantitativa con respecto a los valores.
- Un resultado positivo no define la existencia de infección por *C. difficile* ni tampoco la presencia de *C. difficile* toxigénico, sino solamente indica que se ha detectado el microorganismo. Todas las muestras de materia fecal que dan un resultado positivo con la prueba Premier *C. difficile* GDH deben someterse a pruebas de detección de toxinas para determinar la presencia de *C. difficile* toxigénico.
- La incubación de la prueba por más tiempo del requerido puede causar un aumento en el número de resultados positivos falsos. Por el contrario, la incubación por períodos de tiempo menores que aquellos descritos en este prospecto puede causar un aumento en el número de resultados negativos falsos. Cíñase a los períodos de incubación que se describen en este prospecto.
- Staphylococcus aureus* (cepa Cowan I) y *Clostridium sporogenes* se encontraron dar reacción cruzada con Premier *C. difficile* GDH.
- Esta prueba es para usarse con muestras fecales sin preservar no formadas solamente. Características de ejecución para este tipo de muestra no ha sido establecida.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE FUNCIONAMIENTO:

La prueba Premier *C. difficile* GDH fue evaluada en porcino laboratorios independientes localizados en el las regiones Suroeste, Sureste y Medio-oeste de los Estados Unidos. Se evaluó un total de 733 muestras de pacientes calificados; todas las muestras fueron muestras prospectivas. Se recolectaron muestras de hombres (46 %) y de mujeres (53 %). En 1 % de los casos, se desconocía el género. Los grupos etarios de los pacientes fluctuaron desde 22 días a 99 años de edad. No se observaron diferencias en el funcionamiento de la prueba en función al sexo o a la edad del paciente. Las tablas siguientes muestran el funcionamiento de la prueba por sitio clínico y edad del paciente.

Tabla 1 – Característica de Ejecución por sitio de estudio

Sitio	Muestras Positivas			Muestras Negativas		
	Premier GDH/ Cultivo	Sensitividad %	95 % CI	Premier GDH/ Cultivo	Especificidad %	95% CI
Total Sitios	108/117	92,3 %	86,0 – 95,9 %	590/616	95,8 %	93,9 – 97,1 %
Sitio 1	13/16	81,3 %	57,0 – 93,4 %	84/87	96,6 %	90,3 – 98,8 %
Sitio 2	28/30	93,3 %	78,7 – 98,2 %	132/140	94,3 %	89,1 – 97,1 %
Sitio 3	44/46	95,7 %	85,5 – 98,8 %	147/153	96,1 %	91,7 – 98,2 %
Sitio 4	15/15	100,0 %	79,6 – 100,0 %	169/175	96,6 %	92,7 – 98,4 %
Sitio 5	8/10	80,0 %	49,0 – 94,3 %	58/61	95,1 %	86,5 – 98,4 %

- Muestras discrepantes fueron evaluadas usando una prueba de ELISA aprobada por la FDA para la detección de *C. difficile* GDH.
- Dieciséis de las 26 muestras falsas positivas dieron positivas cuando se corrieron con otro ensayo para GDH aprobado por la FDA.
- Ocho de nueve muestras falsas negativas dieron negativas cuando se corrieron con otro ensayo para GDH aprobado por la FDA.

Tabla 2 – Característica de ejecución por edad del paciente

Edad Paciente	Muestras Positivas			Muestras Negativas		
	Premier GDH/ Cultivo	Sensitividad %	95% CI	Premier GDH/ Cultivo	Especificidad %	95% CI
0-28 días	0/0	N/A	N/A	1/1	100,0 %	20,7 – 100,0 %
29 días a 2 años	22/24	91,7 %	74,2 – 97,7 %	56/60	93,3 %	84,1 – 97,4 %
> 2 años a < 12 años	24/25	96,0 %	80,5 – 99,3 %	106/109	97,2 %	92,2 – 99,1 %
12 años a < 18 años	9/11	81,8 %	52,3 – 94,9 %	59/61	96,7 %	88,8 – 99,1 %
18 años a 21 años	3/4	75,0 %	30,1 – 95,4 %	22/23	95,7 %	79,0 – 99,2 %
> 21 años	50/53	94,3 %	84,6 – 98,1 %	345/361	95,6 %	92,9 – 97,3 %
No Definido	0/0	N/A	N/A	1/1	100,0 %	20,7 – 100,0 %

REPRODUCIBILIDAD

Precisión del ensayo, variabilidad intra-ensayo y variabilidad inter-ensayo fueron evaluadas con un panel de referencia de un combinado de muestras negativas al que se le añadió antígeno GDH de *C. difficile*. El panel de reproducibilidad consistía de muestras positivas mediana (n=3), positivas bajas (n=3) y negativas altas (n=3) y negativas (n=1). Las muestras positivas bajas y negativas altas fueron preparadas cerca del corte del límite de detección. Cada muestra fue evaluada dos veces por día por cinco días por tres diferentes laboratorios. La reproducibilidad fue 100 % sin variabilidad en las pruebas de intra-ensayo y inter-ensayo con muestras preparadas abajo o arriba del límite de detección para el ensayo.

ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA

Los estudios de reactividad cruzada se realizaron con muestras de materia fecal positivas y negativas inoculadas con microorganismos bacterianos y fúngicos hasta lograr una concentración final equivalente a 1,2 x 10⁸ UFC/mL, o una concentración viral mayor que 1 x 10⁵ TCID₅₀/mL. Ninguno de los siguientes microorganismos presentes en la materia fecal reaccionó en la prueba Premier *C. difficile* GDH:

Aeromonas hydrophila, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Group B, *Salmonella* Group C, *Salmonella* Group D, *Salmonella* Group E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Type 40, Adenovirus Type 41, Coxsackievirus Strain B4, Echovirus Strain 11, Rotavirus Strain WA

Se encontró que heces con *Staphylococcus aureus* (cepa Cowan I) y *Clostridium sporogenes* dan reacciones cruzadas con Premier *C. difficile* GDH.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica de la prueba Premier *C. difficile* GDH es 8 células/mL cuando es añadido en las heces.

REACTIVIDAD DE LA PRUEBA

Los siguientes cultivos de reserva de *C. difficile* obtenidos de distintas fuentes se analizaron y produjeron reacciones positivas a concentraciones de 5,7 x 10⁷ UFC/mL con la prueba Premier *C. difficile* GDH.

Cepas toxigénicas de *C. difficile* 8864, 10463, 43598, 2004052, 2004111, 2004118, 2004205, 2004206, 2005070, 2005257, 2005325, 2006240, 2007431, 2007435, 2007858, 2008016, 2008029, 2008162, 2008188, 2008341, 2008351, 2009018, 2009065, 2009066, 2009099, 2009132, 2009155, 2009277, B1, B17, B18, BK6, CF1, G1, J7, K12, Y1

Cepas No-toxigénicas de *C. difficile* 11186, 234, 586, 611, 620, 2C62, 2C165, C122, UNC19904, X15076

PRUEBAS PARA EVALUACIÓN DE SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias, a las concentraciones especificadas de solvente / diluyente saturado no interfieren con los resultados de la prueba a las concentraciones finales anotadas:
Sulfato de Bario a 5 mg/mL, Acido Estearico / Acido Palmitico (grasa fecal) a 2,65 mg/mL/1,3 mg/mL, Hemoglobina a 3,2 mg/mL, Imodium AD® (Loperamide HCl) a $6,67 \times 10^{-3}$ mg/mL, Kaopectate® (Bismuth subsalicylate) a 0,87 mg/mL, Metronidazole a (12,5 mg/mL, Mucina a 3,33 mg/mL, Mylanta® (Ammonium hydroxide w/ magnesium hydroxide) a 4,2 mg/mL, Pepto Bismol® (Omeprazole) a 0,87 mg/mL, Polietileno glicol 3350 a 79,05 mg/mL, Prilosec® a 0,5 mg/mL, Simethicone a 0,625 mg/mL, Tagamet® (Cimetidine) a 0,5 mg/mL, Tums® (Calcium carbonate) a 0,5 mg/mL, Vancomicina hidroclicorica a 2,5 mg/mL, Glóbulos blancos a 5%, Sangre completa a 25%

premier®

C. difficile GDH

Enzym-Immunoassay zum Nachweis von
Clostridium-difficile-GDH in Stuhlproben

REF 611096

IVD

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Premier *C. difficile* GDH ist ein qualitativer Enzym-Immunoassay-Screening-Test für den Nachweis von *Clostridium difficile*-Antigen, Glutamatdehydrogenase, in Stuhlproben von symptomatischen Personen, bei denen eine *C. difficile*-Infektion (CDI) vermutet wird. Dieser Test differenziert nicht zwischen toxischen und nicht toxischen *C. difficile*-Stämmen. Proben von symptomatischen Patienten, die mit diesem Test positive Ergebnisse erbringen, sind weiteren Tests mit einem Assay zu unterziehen, die für den Nachweis von toxischen *C. difficile*-Stämmen und die Unterstützung der CDI-Diagnose konzipiert sind.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Weltweit hat sich *Clostridium difficile* zum wichtigsten Verursacher nosokomialer Diarrhö entwickelt. *C. difficile*-Infektionen (CDI) können von leichter Diarrhö bis hin zum lebensbedrohlichen toxischen Megakolon reichen. Zu den klassischen Risikofaktoren für nosokomiale CDI zählen Antibiotikaaanwendung und höheres Alter. In letzter Zeit wurde CDI jedoch häufiger außerhalb der Krankenhausumgebung und ohne die in der Vergangenheit normalerweise mit *C. difficile*-Infektionen assoziierten Risikofaktoren beobachtet.¹ *C. difficile* produziert zwei Toxine (Toxin A und Toxin B), die beide mit Krankheiten assoziiert sind, die von *C. difficile* verursacht werden. *C. difficile*-Stämme ohne Toxin-A- und Toxin-B-Gene werden als nicht pathogen angesehen. Alle *C. difficile*-Stämme produzieren Glutamatdehydrogenase (GDH), auch als gemeinsames Antigen („common antigen“) bezeichnet.^{2,3} Nicht molekulare Labormethoden für den *C. difficile*-Nachweis lassen sich in zwei allgemeine Gruppen einteilen: auf Toxinbasis und nicht auf Toxinbasis beruhende Methoden. Zu den Assays auf Toxinbasis zählen Enzym-Immunoassay (EIA) auf Toxin A oder die Toxine A und B und Zytotoxin, primär für den Nachweis von Toxin B. Nicht auf Toxinbasis beruhende Assays, wie bspw. EIA für *C. difficile* GDH, sind naturgemäß empfindlicher, erfordern jedoch eine Nachuntersuchung auf toxische *C. difficile*.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Premier *C. difficile* GDH ist ein qualitativer Screening-Enzym-Immunoassay für den Nachweis von *Clostridium difficile*-Antigen, Glutamatdehydrogenase, in Stuhlproben von symptomatischen Personen, bei denen eine *C. difficile*-Infektion (CDI) vermutet wird. In abbrechbare Mikrovertiefungen, die mit Anti-GDH-Antikörpern (Kaninchen) beschichtet sind, werden verdünnte Patientenprobe und ein an Meerrettichperoxidase konjugierter Anti-GDH-Antikörper gegeben und inkubiert. Nach dem Abschluss der Inkubation wird ein Waschschritt durchgeführt, um ungebundenes Material zu entfernen. Bei Vorliegen von *C. difficile*-GDH bildet sich ein Antikörper-Enzymkomplex. Es wird ein chromogenes Substrat in die Mikrovertiefungen gegeben und inkubiert. Bei Vorliegen von gebundenem Enzym bildet sich eine blaue Färbung aus. Nach Zugabe von Stopplösung schlägt die anfängliche blaue Färbung ins Gelbe um. Die Auswertung der Testergebnisse erfolgt spektralphotometrisch.

REAGENZIEN/IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE ARTIKEL

Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Aussenseite der Packung angegeben.

1. **Premier-C.-difficile-GDH-Mikrovertiefungen:** Mit polyklonalem Antikörper beschichtete Mikrovertiefungen. Die Antikörper sind spezifisch für *C. difficile*-GDH.
2. **Premier-C.-difficile-GDH-Enzymkonjugat:** Konjugat aus HRP und polyklonalen spezifischen Antikörpern gegen *C. difficile*-GDH in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,1 % ProClin® und 0,03 % Gentamicin als Konservierungsmittel.
3. **Premier-Waschpuffer II (20fach konzentriert):** Konzentrierter Waschpuffer mit 0,2 % Thiomersal als Konservierungsmittel. Das Reagenz ist vor Gebrauch zu verdünnen.
4. **Premier-Substrat I:** Gepufferte Lösung mit Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin (pH-Wert 5,0).
5. **Premier-Stopplösung I:** 1 M Phosphorsäure.
6. **Premier-C.-difficile-GDH-Probendiluent/Negativkontrolle:** Gepufferte Proteinlösung mit 0,1 % ProClin® und 0,03 % Gentamicin als Konservierungsmittel.
7. **Premier-C.-difficile-GDH-Positivkontrolle:** *C. difficile*-GDH in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,1 % ProClin® und 0,03 % Gentamicin als Konservierungsmitteln.
8. Transferpipetten
9. Mikrovertiefungsstreifenhalter
10. Mikrovertiefungsplattendichtungen

NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE ARTIKEL

1. Einmal-Handschuhe aus Latex
2. Teströhrchen (bspw. 10 x 75 mm oder 12 x 75 mm) für die Probenverdünnung
3. destilliertes oder entionisiertes Wasser
4. Spritzflasche
5. Messzylinder für die Herstellung von 1fach konzentriertem Waschpuffer
6. saugfähiges Papier
7. Abfallbehälter mit Desinfektionsmittel und/oder autoklavierbare Biomüllbeutel
8. Vortexmischer
9. Intervallzeitgeber
10. EIA-Mikrotiterplattenmessgerät für Extinktionen bei 450 bzw. 450/630 nm*
11. Inkubator/Rüttler StatFax™-2200 (StatFax™ ist eine Marke von Awareness Technology, Inc.)* (optional)*
12. Halbautomatisches Mikrotiterplattenwaschgerät (optional)*

*Hinweis: Der Benutzer ist dafür verantwortlich, das StatFax™-Gerät sowie die halbautomatischen Plattenwasch- und Messgeräte vor ihrem Einsatz mit diesem Produkt zu validieren.

VORSICHTSHINWEISE

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.
2. Mikrovertiefungen, Enzymkonjugat, Premier-Substrat I oder Positivkontrolle unterschiedlicher Chargennummern nicht gegeneinander austauschen. (Probendiluent/Negativkontrolle, Premier-Waschpuffer II [20fach konzentriert] und Premier-Stopplösung I können gegeneinander ausgetauscht werden, solange beim Gebrauch die Verfallsdaten nicht abgelaufen sind.)
3. Kitkomponenten nicht über das auf dem Etikett angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
4. Keine Flaschen ohne Etikett, Chargennummer oder Verfallsdatum verwenden.
5. Reagenzien bei Verfärbung oder Trübheit nicht verwenden. Verfärbung oder Trübheit können Anzeichen einer mikrobiellen Kontamination sein.
6. Reagenzien vor Gebrauch auf 21–27 °C aufwärmen lassen.
7. Alle Reagenzien vor Gebrauch behutsam mischen.
8. Die Reagenzienflaschen in angemessenem Abstand und senkrecht über die Vertiefung halten, um eine einheitliche Tropfengröße und Einbringung zu gewährleisten.
9. Die farbigen Verschlüsse wieder auf den richtigen Flaschen anbringen.
10. Die Mikrovertiefungen nicht wieder verwenden.
11. Nicht gebrauchte Mikrovertiefungen müssen wieder im verschließbaren Beutel verwahrt werden. Es ist wichtig, dass die Streifen vor Feuchtigkeit geschützt sind.
12. Für Probenvorbereitung und -transfer müssen die im Lieferumfang dieses Kits enthaltenen Transferpipetten verwendet werden (je eine pro Probe).
13. Um beim Einbringen des verdünnten Stuhls in die Mikrovertiefungen Spritzer zu vermeiden, die Spitze der Transferpipette zur Hälfte in die Vertiefung tauchen und die Probe langsam an der Seite der Vertiefung herunterlaufen lassen.
14. Den Mikrovertiefungswaschgang exakt gemäß den Anweisungen für das Assayverfahren durchführen. **Ein unzureichendes Waschen kann bei jedem EIA-Protokoll zu erhöhten Hintergrundwerten führen.**
15. Alle Reagenzien werden bereits auf die korrekte Konzentration verdünnt geliefert (mit Ausnahme des 20fach konzentrierten Premier-Waschpuffers II).
16. Alle Abweichungen (nach oben oder unten) von den festgelegten Inkubationsdauern können sich auf die Empfindlichkeit und die Spezifität auswirken und sind zu vermeiden.
17. Der Stuhl ist ungeachtet seiner Konsistenz vor dem Pipettieren gut zu mischen, um eine repräsentative Probe zu gewährleisten.

WARNHINWEISE

1. Patientenproben können Krankheitserreger enthalten und sind daher als potenziell biogefährliche Substanzen zu handhaben und zu entsorgen.
2. Gebrauchten Waschpuffer und alle Testmaterialien in einem geeigneten Behälter entsorgen. Abfälle sind als potenziell biogefährliche Substanzen zu erachten.
3. Die Positivkontrolle enthält *C. difficile*-GDH. Sie sollte als potenziell biogefährlich gehandhabt werden.
4. Hautkontakt mit Premier-Stopplösung I vermeiden. Bei Kontakt unverzüglich mit Wasser abspülen.

GEFÄHRDUNGEN UND SICHERHEITSHINWEISE

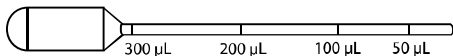
 Premier Stop Solution I	SIGNALWORT Gefahr Gefahrenhinweise H412- Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung H314 - Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden Sicherheitshinweise - Verordnung (EG) §28, Nr. 1272/2008 P260 - Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen P264 - Nach Gebrauch Gesicht, Hände und exponierte Haut gründlich waschen P280 - Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. P305 + P351 + P338 - BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen P303 + P361 + P353 - BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/ duschen. P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen P304 + P340 - BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert P310 - Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen P301 + P330 + P331 - BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen P405 - Unter Verschluss aufbewahren P501 - Inhalt/Behälter einer zugelassenen Einrichtung zur Abfallentsorgung zuführen
 Premier <i>C. difficile</i> GDH 20X Wash Buffer II	Signalwort Gefahr Gefahrenhinweise H302 – Gesundheitsschädlich bei Verschlucken H311 – Giftig bei Hautkontakt Sicherheitshinweise – Verordnung (EG) §28, Nr. 1272/2008 P280 – Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen
 Premier <i>C. difficile</i> GDH Sample Diluent / Negative Control Premier <i>C. difficile</i> GDH Enzyme Conjugate Premier <i>C. difficile</i> GDH Positive Control	Signalwort Gefahr Gefahrenhinweise H314 – Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden H317 – Kann allergische Hautreaktionen verursachen H319 – Verursacht schwere Augenreizung Enthält Mixture, 3(2H)-isothiazolone, 5-chloro-2-methyl- with 2-methyl-3(2H)-isothiazolone Sicherheitshinweise – Verordnung (EG) §28, Nr. 1272/2008 P280 – Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen P260 – Staub oder Nebel nicht einatmen P305 + P351 + P338 – BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen P310 – Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen P303 + P361 + P353 – BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/ duschen P280 – Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Kit-Verfallsdatum ist auf dem Kit-Etikett angegeben. Den Kit bei 2–8 C lagern und nach jedem Gebrauch unverzüglich wieder in den Kühlschrank stellen.

VERFAHRENSANMERKUNGEN

Die Premier-C. *difficile*-GDH-Transferpipette ist im Folgenden abgebildet.



REAGENZENVORBEREITUNG

1. Den gesamten Kit, einschließlich des Beutels mit Mikrovertiefungen, vor Gebrauch auf Raumtemperatur 21–27 C bringen.
2. Den 1fach konzentrierten Waschpuffer nach Bedarf herstellen. Beispielsweise: 10,0 mL des 20fach konzentrierten Premier-Waschpuffers II + 190,0 mL destilliertes oder entionisiertes Wasser sind ausreichend zum Waschen eines Streifens. Der 1fach konzentrierte Waschpuffer kann bei 21–27 C bis zu drei Monate lang gelagert werden.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Humane Stuhlproben, ohne Konservierungsmittel: Die Proben müssen in luftdicht verschlossene Transportbehälter eingebracht werden und bis zum Testen bei 2–8 C gelagert werden. Die Proben sind so bald wie möglich zu testen, können jedoch bei 2–8 C bis zu fünf Tage lang aufbewahrt werden. (Siehe Anweisungen zum Verdünnen von Proben im Abschnitt PROBENVORBEREITUNG.) Proben, die voraussichtlich nicht innerhalb von fünf Tagen getestet werden, sind unmittelbar nach Eingang einzufrieren und bis zum Test bei ≤ –20 C zu lagern. Die Proben können bis zu zwei Monate lang eingefroren und zweimal eingefroren und aufgetaut werden.

PROBENVORBEREITUNG

Den Stuhl vor dem Pipettieren möglichst gründlich mischen.

1. **Humane Stuhlproben, ohne Konservierungsmittel:**
 - a. Mit Hilfe der Tropfeinheit (oder eines vergleichbaren Produkts) 200 µL Probendiluent/Negativkontrolle in ein kleines Teströhrchen geben.
 - b. **Flüssige/halb feste Stuhlproben:**
 - i. Mit Hilfe einer der im Lieferumfang des Kits enthaltenen Transferpipetten 50 µL (erste Markierung ab der Pipettenspitze) gut durchgemischten Stuhls in das Röhrchen mit Probendiluent/Negativkontrolle geben.
 - ii. Das Gemisch mindestens 15 Sekunden lang mit dem Vortexmischer mischen.
 - iii. Die Transferpipette zur späteren Verwendung im Teströhrchen aufbewahren.
 - c. **Stuhlproben verdünnt in Probendiluent:** Wenn nötig, kann die in Probendiluent verdünnte Stuhlprobe vor dem Testen bis zu 24 Stunden bei 2–27 C gelagert werden, sofern das Teströhrchen verschlossen ist.
 - d. Die Stuhlproben können nach der Verdünnung zentrifugiert werden. Die Proben bei ungefähr 2750 g 3 Minuten lang zentrifugieren bzw. bis sich die festen Bestandteile von der Flüssigkeit trennen. Den Test mit dem gewonnenen Überstand durchführen.

TESTVERFAHREN

1. Nachdem der Beutel eine Temperatur zwischen 21 und 27 °C erreicht hat, die benötigte Anzahl Mikrovertiefungen abbrehen (je 1 Vertiefung pro Probe, plus 1 Positiv- und 1 Negativkontrolle-Vertiefung pro Ansatz). Die Mikrovertiefungen in den Mikrovertiefungsstreifenhalter geben und die Position der einzelnen Vertiefungen notieren. Nicht benötigte Mikrovertiefungen sofort wieder im Beutel verschließen.
2. Mit Hilfe der Probentransferpipette 100 µL verdünnten Stuhls (zweite Markierung ab der Pipettenspitze) in die entsprechende Vertiefung geben. (Die Pipettenspitze zur Hälfte in die Vertiefung tauchen und die Probe langsam an der Seite der Vertiefung herunterlaufen lassen.)
3. Zwei frei fallende Tropfen Positivkontrolle hinzugeben. Mit Hilfe einer Transferpipette 100 µL (zweite Markierung ab der Pipettenspitze) Probendiluent/Negativkontrolle in die entsprechenden Vertiefungen geben.
4. Einen frei fallenden Tropfen (ca. 50 µL) Enzymkonjugat in jede Vertiefung geben. Die Platte 30 Sekunden lang kräftig rütteln/schwenken.
5. Die Plattendichtung zurechtschneiden und zum Abdichten fest auf die Oberseite der Mikrovertiefungen drücken. Die Platte 50 Minuten lang bei 35–39 °C inkubieren. **Alternativ dazu können Labors, die mit einem heizbaren Plattenrüttler (Stat Fax™-2200) ausgestattet sind, die Platte 20 Minuten lang bei 37 °C und 1000 U/min (Einstellung 5) inkubieren und rotieren lassen.**
6. Die Plattendichtung behutsam entfernen und die Vertiefungen auswaschen:
 - a. **Manuelle Methode:**
 - i. Den Platteninhalt resolut in einen Behälter für biogefährlichen Abfall ausleeren.
 - ii. Die umgedrehte Platte auf einem sauberen Stapel Papiertücher ausklopfen.
 - iii. Alle Vertiefungen mit 1fach konzentriertem Waschpuffer füllen; dabei den Pufferstrahl auf die Vertiefungsseiten richten, um Schaumbildung zu vermeiden.
 - iv. Den Waschzyklus (Auskippen, Ausklopfen auf frischen Papiertüchern, Füllen) 4 bis 6 Mal wiederholen (insgesamt 5–7 Waschzyklen). Nach dem letzten Füllen die Platten auskippen und auf frischen Tüchern hart genug ausklopfen, um soviel überschüssigen Waschpuffer wie möglich zu entfernen, die Vertiefungen aber zu keiner Zeit vollständig austrocknen lassen.
 - b. **Halbautomatisierte Waschmethode:**
 - i. Den Platteninhalt resolut in einen Behälter für biogefährlichen Abfall ausleeren.
 - ii. Die umgedrehte Platte auf einem sauberen Stapel Papiertücher ausklopfen und die leere Platte anschließend in ein Waschgerät platzieren.
 - iii. Die Vertiefungen bis zum oberen Rand mit 1fach konzentriertem Waschpuffer füllen (ca. 300–350 µL/Vertiefung) und anschließend aspirieren. Der Waschgerätverteiler ist so einzustellen, dass es während des Füllens der Vertiefungen nicht zu Schaumbildung kommt und dass die Vertiefungen nach jedem Waschgang gründlich aspiriert werden.
 - iv. Schritt iii noch 4 Mal wiederholen. Die Testvertiefungen sind nach dem letzten Waschgang gründlich zu aspirieren, um möglichst viel Feuchtigkeit zu entfernen. Die Vertiefungen jedoch niemals vollständig austrocknen lassen.
7. Zwei frei fallende Tropfen (ca. 100 µL) Premier-Substrat-Lösung I in jede Vertiefung geben. Die Platte 30 Sekunden lang kräftig rütteln/schwenken. Die Platte 10 Minuten lang bei 21–27 °C inkubieren.
8. Zwei frei fallende Tropfen (ca. 100 µL) Premier-Stopplösung I in jede Vertiefung geben. Die Platte 30 Sekunden lang kräftig rütteln/schwenken. **Hinweis:** Bei einer positiven Reaktion zeigt sich zunächst eine blaue Färbung, die nach Zugabe der Premier-Stopplösung I ins Gelbe umschlägt.
9. Die Unterseite aller Vertiefungen mit einem fusselfreien Tuch reinigen.
10. Die Reaktionen überprüfen und notieren. Die Testergebnisse können mit Hilfe eines Spektralphotometermessgeräts erfasst werden. Eine Nullkalibrierung des EIA-Messgeräts an der Luft durchführen. Die Extinktion bei 450 nm bzw. 450/630 nm innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Premier-Stopplösung I bestimmen.
11. Erbringt die Negativkontrolle und/oder die Positivkontrolle ständig außerhalb der Vorgabewerte liegende Ergebnisse, ist zu vermuten, dass die Waschmethode bzw. das Produkt nicht einwandfrei waren. Das Problem dürfte sich durch vermehrte Waschgänge, kräftigeres Waschen, gründlicheres Abgießen oder Neukalibrieren der Waschgeräte beheben lassen. Bei fortgesetzten Schwierigkeiten bitte unter der Rufnummer 800-343-3858 (gebührenfrei innerhalb der USA) von Meridians Technical Support Services bzw. vom zuständigen Meridian-Vertriebshändler Unterstützung anfordern.

ERGEBNISINTERPRETATION

Spektralphotometrische Auswertung, eine Wellenlänge (450 nm)

Negativ:	< 0,200
Positiv:	≥ 0,200
Negativkontrolle:	< 0,150
Positivkontrolle:	≥ 0,600

Spektralphotometrische Auswertung, doppelte Wellenlänge (450/630 nm)

Negativ:	< 0,150
Positiv:	≥ 0,150
Negativkontrolle:	< 0,100
Positivkontrolle:	≥ 0,600

Beträgt einer der Werte der Negativkontrolle < 0,000, mit dem Plattenmessgerät eine erneute Leerwertmessung an der Luft durchführen und die Platte erneut ablesen.

Ein positives Ergebnis deutet auf das Vorliegen von *C.-difficile*-GDH hin. Ein negatives Ergebnis deutet auf die Abwesenheit von *C.-difficile*-GDH hin oder darauf, dass die GDH-Konzentration unterhalb des vom Assay nachweisbaren Werts liegt. Die Größenordnung oberhalb des OD-Schwellenwerts ist weder aussagekräftig für den Schweregrad oder das Ausmaß der *C.-difficile*-Infektion noch mit einem Endpunkttiter korrelierbar. Extrem stark positive Proben können innerhalb einiger Minuten nach dem Stoppen der Reaktion eine intensive Gelbfärbung aufweisen oder eine violette Ausfällung. In einem solchen Fall kann das Spektralphotometer einen „Außerhalb“-Messwert liefern. Ein solcher Messwert ist als positives Ergebnis zu erachten.

Entspricht die Frequenz schwach positiver Ergebnisse (OD zwischen 0,200 und 0,250 bei einer Wellenlänge und zwischen 0,150 und 0,200 bei zwei Wellenlängen) mehr als 5 % der getesteten Proben, kann dies auf einen unzulänglichen Waschgang hindeuten. Es empfiehlt sich, einen kräftigeren Waschgang durchzuführen oder die Waschzykluszahl auf sieben zu erhöhen (Verfahrensschritt 6).

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.

1. Die Kitkomponenten vor jedem Gebrauch auf offensichtliche Anzeichen von Mikrobenkontamination, Gefrieren oder Flüssigkeitsaustrittsichtprüfungen. Kontaminierte oder fragwürdige Reagenzien nicht verwenden.
2. Die Premier *C.-difficile*-GDH-Leistung sollte bei jedem Testansatz unter Verwendung der Positivkontrolle und Probendiluent/Negativkontrolle überprüft werden. Angaben zu den zu erwartenden Ergebnissen für Kontrollreagenzien bietet der vorhergehende Abschnitt ERGEBNISINTERPRETATION. Die Tests sind als ungültig zu erachten, wenn eines der Kontrollreagenzien nicht die erwarteten Ergebnisse erbringt. In derartigen Fällen sind die Tests und Kontrollen erneut zu analysieren. Lassen sich auch bei wiederholten Tests mit Reagenzien, deren Verfallsdaten noch nicht abgelaufen sind, die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte unter der Rufnummer +1 800-343-3858 (gebührenfrei innerhalb der USA) von Meridians Technical Support Services bzw. vom zuständigen Meridian-Vertriebshändler Unterstützung anfordern.
3. Die Kontrollen dienen zur Überwachung der Reagenzienreaktivität. Erbringen die Kontrollen nicht die erwarteten Ergebnisse, kann dies bedeuten, dass mindestens eines der Reagenzien zum Zeitpunkt seiner Verwendung nicht mehr reaktionsfähig war, dass der Test nicht ordnungsgemäß durchgeführt wurde oder dass Reagenzien oder Proben nicht hinzugegeben wurden. **Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, wiederholen Sie zur Ermittlung der Fehlerquelle als Erstes die Kontrolltests. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Vertriebspartner.**
4. Bei diesem Assay wurden keine Probenmatrixstörungen beobachtet, da die Proben vor dem Testen stark mit Probendiluent verdünnt werden. Aus diesem Grund werden die als Assay-Bestandteile mitgelieferten Positiv- und Negativkontrollen in Matrices zubereitet, die dem Probendiluent gleichen. Falls die Zusammensetzung der Kontrollmaterialien mit der der Testproben identisch sein soll, kann der Anwender dies durch Verdünnen bekanntermaßen positiver und negativer Proben mit Probendiluent gemäß dem Abschnitt PROBENVORBEREITUNG dieser Packungsbeilage erreichen. In die Testvertiefungen 100 µL der vom Benutzer zubereiteten Kontrollen geben.

ERWARTUNGSWERTE

Die Häufigkeit der durch *C.-difficile* verursachten, mit Antibiotika assoziierten Diarrhö ist abhängig von mehreren Faktoren, darunter: Patientenpopulation, Art der Einrichtung und Epidemiologie. Berichten zufolge beträgt die Inzidenz von *C.-difficile*-Infektionen bei Patienten, die vermutlich an mit Antibiotika assoziierter Diarrhö leiden, 15–25 %.⁴ Jedoch können die Positivitätsquoten einzelner Einrichtungen außerhalb dieses Bereichs liegen.

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Nur zur *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.
2. Der Test ist qualitativ und es sollte keine quantitative Interpretation der Werte erfolgen.
3. Ein positives Ergebnis bestimmt keine *C.-difficile*-Infektion oder das Vorliegen von toxischem *C. difficile*, sondern zeigt lediglich den Nachweis des Organismus an. Alle positiven Premier *C.-difficile*-GDH Stuhlproben sind zu testen, um ein Vorliegen von toxischem *C.-difficile* zu bestätigen.
4. Eine übermäßige Testinkubation kann vermehrt zu falsch positiven Testergebnissen führen. Dagegen können kürzere Inkubationsdauern als in dieser Packungsbeilage angegeben vermehrt zu falsch negativen Testergebnissen führen. Die in dieser Packungsbeilage angegebenen Inkubationsdauern sind einzuhalten.
5. *Staphylococcus aureus* (Cowan-Stamm I) und *Clostridium sporogenes* haben sich mit Premier *C. difficile* GDH als kreuzreaktiv erwiesen.
6. Dieser Test ist ausschließlich für ungeformte Stuhlproben ohne Konservierungsmittel vorgesehen. Die Leistungsmerkmale bei anderen klinischen Probentypen wurden nicht ermittelt.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Premier *C. difficile* GDH wurde von fünf unabhängigen Testzentren im Südwesten, Südosten und Mittleren Westen der USA untersucht. Es wurden insgesamt 733 qualifizierte Patientenproben untersucht; bei allen Proben handelte es sich um Prospektivproben. Die Proben stammten von männlichen (46 %) und weiblichen (53 %) Personen. Bei 1 % der Patienten war das Geschlecht nicht bekannt. Die Altersgruppen der Patienten reichten von 22 Tagen bis 99 Jahren. Es zeigten sich keine auf Alter oder Geschlecht der Patienten zurückzuführenden Testleistungsunterschiede. In den folgenden Tabellen ist die Assay-Leistung nach klinischem Standort und Patientenalter aufgeführt.

Tabelle 1. Leistungsmerkmale nach klinischem Standort

Stand-ort	Positive Proben			Negative Proben		
	Premier GDH/ Kultur	Empfind-lichkeit (in %)	95%-VB	Premier GDH/ Kultur	Spezifität (in %)	95%-VB
Standorte insgesamt	108/117	92,3 %	86,0 – 95,9 %	590/616	95,8 %	93,9 – 97,1 %
Standort 1	13/16	81,3 %	57,0 – 93,4 %	84/87	96,6 %	90,3 – 98,8 %
Standort 2	28/30	93,3 %	78,7 – 98,2 %	132/140	94,3 %	89,1 – 97,1 %
Standort 3	44/46	95,7 %	85,5 – 98,8 %	147/153	96,1 %	91,7 – 98,2 %
Standort 4	15/15	100,0 %	79,6 – 100,0 %	169/175	96,6 %	92,7 – 98,4 %
Standort 5	8/10	80,0 %	49,0 – 94,3 %	58/61	95,1 %	86,5 – 98,4 %

- Abweichende Proben wurden mit einem von der US-amerikanischen Lebens- und Arzneimittelbehörde FDA zugelassenen ELISA-Test für den *C. difficile* GDH-Nachweis untersucht.
- Sechzehn der 26 falsch positiven Proben fielen beim Testen mit einem anderen von der FDA zugelassenen GDH-Assay positiv aus.
- Acht der neun falsch negativen Proben fielen beim Testen mit einem anderen von der FDA zugelassenen GDH-Assay negativ aus.

Tabelle 2. Leistungsmerkmale nach Patientenalter

Patienten-alter	Positive Proben			Negative Proben		
	Premier GDH/ Kultur	Empfind-lichkeit (in)	95%-VB	Premier GDH/ Kultur	Spezifität (in %)	95%-VB
0 bis 28 Tage	0/0	N/A	N/A	1/1	100,0 %	20,7 – 100,0 %
29 Tage bis < 2 Jahre	22/24	91,7 %	74,2 – 97,7 %	56/60	93,3 %	84,1 – 97,4 %
2 Jahre bis < 12 Jahre	24/25	96,0 %	80,5 – 99,3 %	106/109	97,2 %	92,2 – 99,1 %
12 Jahre bis < 18 Jahre	9/11	81,8 %	52,3 – 94,9 %	59/61	96,7 %	88,8 – 99,1 %
18 Jahre bis 21 Jahre	3/4	75,0 %	30,1 – 95,4 %	22/23	95,7 %	79,0 – 99,2 %
> 21 Jahre	50/53	94,3 %	84,6 – 98,1 %	345/361	95,6 %	92,9 – 97,3 %
Keine Angaben	0/0	N/A	N/A	1/1	100,0 %	20,7 – 100,0 %

WIEDERHOLBARKEIT

Assay-Präzision, Schwankungen innerhalb eines Assays sowie Schwankungen zwischen Assays wurden anhand eines Referenzprofils aus Pools negativer Proben, die mit *C.-difficile* GDH-Antigen beimpft wurden, erstellt. Das Wiederholbarkeitsprofil bestand aus mäßig positiven (n=3), schwach positiven (n=3), hochgradig negativen (n=3) und negativen Proben (n=1). Die schwach positiven und hochgradig negativen Proben wurden nahe der Empfindlichkeitsgrenze des Assays erstellt. Jede Probe wurde in drei verschiedenen Labors an fünf aufeinander folgenden Tagen zweimal täglich untersucht. Die Wiederholbarkeit der Probenzubereitungen, die über oder unter der Analysenempfindlichkeitsgrenze liegen, betrug 100 % ohne Schwankungen innerhalb eines Assays bzw. zwischen Assays.

STUDIEN ZUR KREUZREAKTIVITÄT

Es wurden Kreuzreaktivitätsstudien mit positiven und negativen Stuhlproben durchgeführt, die mit Bakterien oder Pilzen auf Endkonzentrationen bis zu $1,2 \times 10^8$ KBE/mL bzw. mit Viren auf Konzentrationen von mehr als 1×10^5 TCID₅₀/mL beimpft waren. Keiner der folgenden, im Stuhl vorhandenen Organismen reagierte mit Premier *C.-difficile* GDH:

Aeromonas hydrophila, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium bifementans*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Gruppe B, *Salmonella* Gruppe C, *Salmonella* Gruppe D, *Salmonella* Gruppe E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus Typ 40, Adenovirus Typ 41, Coxsackievirus Stamm B4, Echovirus Stamm 11, Rotavirus Stamm WA

Stuhlproben, die mit *Staphylococcus aureus* (Cowan-Stamm I) und *Clostridium sporogenes* beimpft wurden, zeigten Kreuzreaktionen mit dem Premier *C.-difficile* GDH Test.

TESTEMPFINDLICHKEIT

Die Testempfindlichkeit von Premier *C.-difficile* GDH-Assays ist bei Stuhlzusätzen 8 ng/mL.

ASSAY-REAKTIVITÄT

Die folgenden *C.-difficile*-Stammkulturen verschiedener Quellen ergaben beim Testen mit Premier *C. difficile* GDH positive Reaktionen bei $5,7 \times 10^7$ KBE/mL.

Toxigene *C.-difficile*-Stämme: 8864, 10463, 43598, 2004052, 2004111, 2004118, 2004205, 2004206, 2005070, 2005257, 2005325, 2006240, 2007431, 2007435, 2007858, 2008016, 2008029, 2008162, 2008188, 2008341, 2008351, 2009018, 2009065, 2009066, 2009099, 2009132, 2009155, 2009277, B1, B17, B18, BK6, CF1, G1, J7, K12, Y1

Nicht toxische *C.-difficile*-Stämme: 11186, 234, 586, 611, 620, 2C62, 2C165, C122, UNC19904, X15076

TESTS AUF STÖRSUBSTANZEN

Die folgenden Substanzen zeigten in den angegebenen gesättigten Lösungen/Verdünnungen und den aufgeführten Endkonzentrationen keine Auswirkungen auf die Testergebnisse:
Bariumsulfat (5 mg/mL), Stearinsäure/Palmitinsäure (Stuhlfette, 2,65 mg/mL bzw. 1,3 mg/mL), Hämoglobin (3,2 mg/mL), Imodium AD® (Loperamid-HCl, $6,67 \times 10^{-3}$ mg/mL), Kaopectate® (Wismutsubsalicylat, 0,87 mg/mL), Metronidazol (12,5 mg/mL), Mucin (3,33 mg/mL), Mylanta® (Ammoniumhydroxid mit Magnesiumhydroxid) (4,2 mg/mL), Pepto-Bismol® (Wismutsubsalicylat, 0,87 mg/mL), Polyethylenglykol 3350 (79,05 mg/mL), Prilosec® (Omeprazol, 0,5 mg/mL), Simethicone (0,625 mg/mL), Tagamet® (Cimetidin, 0,5 mg/mL), Tums® (Calciumcarbonat, 0,5 mg/mL), Vancomycin – Hydrochlorid (2,5 mg/mL), weiße Blutkörperchen (5 %), Vollblut (25 %)

REFERENCES

1. Dawson LF, Valiente E, Wren B. *Clostridium difficile* - A continually evolving and problematic pathogen. Infect Genet Evol 2009;9:1410-1417.
2. Lysterly DM, Barroso LA, Wilkins TD. Identification of the latex-reactive protein of *Clostridium difficile* as glutamate dehydrogenase. J Clin Micro 1991;29:2639-2642.
3. Willis, DH, Kraft JA. Confirmation that the latex-reactive protein of *Clostridium difficile* is a glutamate dehydrogenase. J Clin Micro 1992;30:1363-1364.
4. Bartlett JG, Gerding D. Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clin Inf Dise 2008;46:S12-18.



SN11082

REV. 01/24

 Manufactured By	Meridian Bioscience, Inc. 3471 River Hills Drive Cincinnati, OHIO - 45244 USA www.meridianbioscience.com <u>Contacts:</u> Main Telephone (+1) 513.271.3700 Customer Service/Orders 800.543.1980 Technical Support Center 800.343.3858 Information Fax: 513.272.5432 Ordering Fax: 513.271.0124 E-mail: info@meridianbioscience.com
	Meridian Bioscience Europe, SRL Via Dell'Industria 7, 20035 Villa Cortese (Milano) ITALY www.meridianbioscience.com <u>Contacts:</u> Main Telephone (+39) 0331.433636 E-mail: info@meridianbioscience.eu Technical Support: MBE-TechService@meridianbioscience.eu Customer Service/Orders: - For Italian Customers: ordini@meridianbioscience.com - For Distributors / International Customers: Export.CustomerService@meridianbioscience.eu
AUSTRALIAN SPONSOR	Emergo Australia Level 20, Tower II Darling Park 201 Sussex Street Sydney, NSW 2000 Australia

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/package of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guía de símbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	Meridian products carrying the European Conformity (CE) mark fulfill the requirements of Directive 98/79/EC or the Regulation 2017/746 on in-vitro diagnostic medical devices / I prodotti Meridian recanti il marchio di Conformità Europea (CE) soddisfano i requisiti della Direttiva 98/79/CE o del Regolamento 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Les produits Meridian portant la marque de Conformité européenne (CE) sont conformes aux exigences de la Directive 98/79/CE ou du Règlement 2017/746 relatifs aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Los productos de Meridian que llevan la marca de conformidad europea (CE) cumplen los requisitos de la Directiva 98/79/CE o del Reglamento 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Produkte von Meridian mit der CE-Kennzeichnung erfüllen die Anforderungen der EU-Richtlinie 98/79/EG bzw. der Verordnung (EU) 2017/746 über in-vitro-Diagnostika	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
			CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaución: Peligroso / WARNUNG: Risikogefahr
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Numero de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Eingrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabbricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" test / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitaiton / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjugado enzimático / enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrollttest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration 20X / Soluzione dil lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
Rx Only	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Detection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz
	Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / ne pas utiliser si le paquet est endommagé / No use si el paquete esta dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist	TUBE	Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß
	Single Use Only / Prodotto Monouso / A usage unique / Para Un Solo Uso / nur für die einmalige Anwendung	CH REP	Swiss Authorized Representative / Mandatario svizzero / Mandataire Suisse / Representante Autorizado Suizo / Schweizer Bevollmächtigter

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at 800-543-1980.