



## Instructions for Use

# Clostridium difficile Toxin A+B Ag ELISA

IVD



REF EIA-4448

Σ 96



DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße. 18, 35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:



DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.  
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

### Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTRODUCTION.....	2
2	INTENDED USE.....	2
3	PRINCIPLE OF THE TEST.....	2
4	TEST COMPONENTS FOR 96 WELLS.....	3
5	PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES.....	3
6	MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.....	4
7	PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS.....	4
8	ASSAY PROCEDURE.....	4
9	RESULT INTERPRETATION.....	6
10	REFERENCE VALUES.....	6
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	7
12	COMMON ADVICES AND PRECAUTIONS.....	8
1	EINFÜHRUNG.....	9
2	ANWENDUNGSBEREICH.....	9
3	TESTPRINZIP.....	9
4	TESTKOMPONENTEN.....	10
5	VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER PROBEN.....	10
6	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN UND HILFSMITTEL.....	11
7	VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN.....	11
8	TESTDURCHFÜHRUNG.....	11
9	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE.....	13
10	REFERENZWERTE.....	13
11	LEISTUNGSMERKMALE.....	14
12	ALLGEMEINE HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	15
1	INTRODUZIONE.....	16
2	INDICAZIONI.....	16
3	PRINCIPIO DEL TEST.....	16
4	CONTENUTO DEL TEST PER 96 POZZETTI.....	17
5	PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.....	17
6	MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI.....	18
7	PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI.....	18
8	PROCEDURA DEL TEST.....	18
9	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.....	20
10	VALORI DI RIFERIMENTO.....	20
11	CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO.....	21
12	PRECAUZIONI E AVVERTENZE.....	22
	SYMBOLS USED.....	23

## 1 INTRODUCTION

Clostridium difficile is a bacterium causing nosocomial diarrhea in adults during or after the treatment with antibiotics such as 3rd generation cephalosporines (1). Although 2-3% of healthy adults and 20-50% of healthy children are colonized with Clostridium difficile, the infection is usually of exogenous origin and results from the contact either to hospital staff or to Clostridium difficile spores which may contaminate toilets, bed clothes etc.

Both exotoxins A and B of this spore-forming bacteria cause the depolymerisation of actin filaments due to the intracellular enzymatic modification of rho-proteins. Consequently, the permeability of cell membrane is raised and neutrophils may invade leading to expression of the clinical picture of the so-called Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis or finally the pseudomembranous colitis (PMC) (1).

As the production of toxins and the outbreak of disease is correlated, diagnosis of Clostridium difficile infection is based mainly on a direct detection of the toxins in stool specimens. To date the cytotoxicity test has been considered as the gold standard for detection of Clostridium difficile toxins. Recently it has been replaced to a large extent by immunological tests such as enzyme immunoassay (2).

### References:

1. Rambaud J.-C., LaMont J.-T. (Hrsg.): "Ökosystem Darm Special- Updates on Clostridium difficile" Springer Verlag 1995
2. Wilkins T.D. and Lyerly D.M. (2003): „Clostridium difficile Testing: after 20 Years, Still Challenging“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 41, No. 2, p. 531-534

## 2 INTENDED USE

The ***Clostridium difficile Toxin A+B Ag ELISA*** is an in vitro diagnostic device for direct detection of the toxins A and B of Clostridium difficile in stool specimens and culture suspensions.

## 3 PRINCIPLE OF THE TEST

The *Clostridium difficile Toxin A + B ELISA* is an indirect two-site-immunoassay for the qualitative determination of both Clostridium difficile toxins A and B based on polyclonal and monoclonal antibodies.

Clostridium difficile toxins of stool specimens or culture suspensions and the positive control react with monoclonal anti-toxin A and polyclonal anti-toxin B antibodies coated on the solid phase of the microplate. After incubation non-bound material is removed by a washing step.

Subsequently bound toxins specifically react with biotinylated polyclonal anti-toxin A and monoclonal anti-toxin B antibodies during a second incubation period. Non-bound material is separated from the solid-phase immune complexes by a subsequent washing step.

During the next incubation period horseradish peroxidase (HRP) conjugated streptavidin reacts with the bound biotinylated antibodies. Unbound conjugate is removed by a washing step.

HRP converts the subsequently added colourless substrate solution of 3,3',5,5'-tetra-methylbenzidine (TMB) into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells turning the solution from blue to yellow.

The optical density (OD) of the solution read at 450/620 nm is directly proportional to the specifically bound amount of Clostridium difficile toxin A and B.

After consideration of the cut-off value, results are interpreted as positive or negative.

#### 4 TEST COMPONENTS FOR 96 WELLS

1	<b>WELLS</b>	<b>Microtitration plate</b> coated with monoclonal anti-Toxin A- (mouse) and polyclonal anti-Toxin B-antibodies (rabbit)	12 single breakable 8-well strips colour coding red vacuum-sealed with desiccant
2	<b>WASHBUF CONC 10x</b>	<b>Wash buffer</b> 10-fold	100 mL concentrate for 1000 mL solution white cap
3	<b>DIL</b>	<b>Sample diluent</b>	100 mL · ready to use coloured yellow black cap
4	<b>CONTROL +</b>	<b>Positive control</b> <i>C. difficile</i> Toxin reactive sample	2.0 mL · ready to use coloured blue red cap
5	<b>CONTROL -</b>	<b>Negative control</b> <i>C. difficile</i> Toxin negative sample	2.0 mL · ready to use coloured blue green cap
6/1	<b>CONJ BIOTIN</b>	<b>Biotin-conjugate</b> Biotinylated, polyclonal anti-Toxin A- (rabbit) and monoclonal anti-Toxin B-antibodies (mouse)	15 mL · ready to use coloured green white cap
6/2	<b>CONJ STREPT</b>	<b>Streptavidin-HRP-conjugate</b>	15 mL · ready to use coloured red brown cap
7	<b>SUBSTR TMB</b>	<b>Substrate</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	15 mL · ready to use blue cap
8	<b>STOP</b>	<b>Stop solution</b> 0.25 M sulphuric acid	15 mL · ready to use yellow cap

#### 5 PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLES

##### 5.1 Toxin detection from stool specimens

###### Collection and storage

Stool samples should be stored at 2 °C - 8 °C immediately after collection and processed within 72 hours or frozen at -80 °C. Storage at -20 °C as well as repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Formalin-preserved stool samples should not be used in this assay.

Stool samples already diluted with sample diluent can be stored for up to 72 h at 2 °C - 8 °C and tested on the following day.

###### Preparation

Warm samples to room temperature and mix well.

Pipette **1000 µL** of sample diluent into a clean tube.

Using a disposable stirring rod transfer about **200 mg** (diameter about 2-3 mm) of faeces if solid or pipette **200 µL** if liquid into the tube and suspend thoroughly.

If necessary spin down floating particles in a micro centrifuge at maximum speed for 1 minute.

##### 5.2 Toxin detection from culture suspensions (toxigenic culture)

Colonies of *Clostridium difficile* grown on blood or CCFA agar for 48 hours can be tested directly in the *Clostridium difficile* Toxin A+B ELISA.

Prepare a bacterial suspension according to Mc Farland standard 1 (OD value at 600 nm: 0.20 - 0.25 after zero compensation to the yellow coloured sample diluent):

Pipette **1000 µL** of sample diluent into a clean tube,

Transfer **2 - 4 inoculating loops** of a *C. difficile* culture into the sample diluent and suspend on a vortex mixer. Read OD value at 600 nm as described above where required.

Use 100 µL for ELISA testing.

If selective culture media are used the detectable amount of toxins may be reduced due to inhibitory components of such media resulting in decreased OD values in the ELISA. Therefore using selective media for toxigenic culture requires the preparation of a bacterial suspension at least according to Mc Farland standard 4 (OD 600 nm > 1.0 after zero compensation to the yellow coloured sample diluent). In this case the *Clostridium difficile* colonies of at least half of a densely grown agar plate have to be harvested. Where required the recommendations and instructions of the medium manufacturers are to be observed.

## 6 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Micropipettes
- Multi-channel pipette or multi-pipette
- Reagent container for multi-channel pipette
- 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer or 8-channel pipette
- Microplate reader with optical filters for 450 nm for measurement and ≥ 620 nm for reference.
- Distilled or de-ionized water
- Glassware
- Tubes (2 mL) for sample preparation
- Orbital shaker for performance of test variant 2

## 7 PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

### 7.1 Kit size and expiry

One kit is designed for 96 determinations.

The expiry date of each component is reported on its respective label, of the complete kit on the outer box label.

Upon receipt, all test components have to be kept at 2 °C - 8 °C, preferably in the original kit box.

After opening all kit components are stable for at least 2 months, provided proper storage.

This ready to use wash solution is stable for at least one month when stored at 2 °C - 8 °C.

### 7.2 Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay.

The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the 10-fold concentrated *Wash Buffer 1 + 9* with distilled or de-ionized water.

For Example: 10 mL *Wash Buffer* concentrate + 90 mL distilled or deionized water.

## 8 ASSAY PROCEDURE

The *Clostridium difficile* Toxin A+B ELISA can be performed in two ways:

1. Incubation without shaking;  
complete test duration 2 hours and 15 minutes
  2. Incubation with shaking;  
complete test duration 1 hour and 15 minutes
- o Dilute samples with sample diluent (3) 1 : 6 e.g. 200 mg or 200 µL stool + 1.0 mL sample diluent (3)  
- or -  
Transfer 2-4 inoculation loops of a *C. difficile* colony into a tube with 1.0 mL sample diluent (3) and mix thoroughly on a vortex.
  - o Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.
  - o Make sure the soak time of the wash buffer in the wells is at least 5 seconds per wash cycle.
  - o Avoid direct light exposure of the TMB substrate solution!

**8.1 Working steps variant 1: without shaking**

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Pipette:  
**100 µL** **CONTROL +** positive control (4)  
**100 µL** **CONTROL -** negative control (5)  
**100 µL** diluted stool specimen or culture suspension
3. Cover plate and incubate for 60 min at RT.
4. Decant, then wash each well 5x with **300 µL** wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper.
5. Dispense **3 drops (or 120 µL)** **CONJ BIOTIN** biotin-conjugate (6/1) per well.
6. Cover plate and incubate for 30 min at RT.
7. Decant, then wash each well 5x with **300 µL** wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper.
8. Dispense **3 drops (or 120 µL)** **CONJ STREPT** streptavidin-HRP-conjugate (6/2) per well.
9. Cover plate and incubate for 30 min at RT
10. Decant, then wash each well **5x with 300 µL** wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper.
11. Dispense **3 drops (or 120 µL)** **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
12. Incubate for 15 min at RT protected from light.
13. Dispense **3 drops (or 120 µL)** **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
14. Read OD at 450 nm /  $\geq 620$  nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

**8.2 Working steps variant 2: with shaking**

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Pipette:  
**100 µL** **CONTROL +** positive control (4)  
**100 µL** **CONTROL -** negative control (5)  
**100 µL** diluted stool specimen or culture suspension.
3. Cover plate and incubate for 30 min at RT on an orbital shaker with a frequency of 500-700/min.
4. Decant, then wash each well **5x with 300 µL** wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper.
5. Dispense **3 drops (or 120 µL)** **CONJ BIOTIN** biotin-conjugate (6/1) per well.
6. Cover plate and incubate for 15 min at RT on an orbital shaker with a frequency of 500-700/min.
7. Decant, then wash each well 5x with 300 µL wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper.
8. Dispense **3 drops (or 120 µL)** **CONJ STREPT** streptavidin-HRP-conjugate (6/2) per well.
9. Cover plate and incubate for 15 min at RT on an orbital shaker with a frequency of 500-700/min.
10. Decant, then wash each well **5x with 300 µL** wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper.
11. Dispense **3 drops (or 120 µL)** **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
12. Incubate for 15 min at RT without shaking protected from light.
13. Dispense **3 drops (or 120 µL)** **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
14. Read OD at 450 nm /  $\geq 620$  nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

## 9 RESULT INTERPRETATION

### Qualitative evaluation

**Cut-off determination: OD negative control + 0.20**

Samples with absorbances higher than the cut-off value are considered **positive**,

samples with absorbances 10% below the cut-off value are considered **negative** for Clostridium difficile toxin A and B antigen.

Samples within 10 % below the cut-off up to the cut-off value have to be considered **borderline** and should be repeatedly tested. In case of repeated borderline result a second sample of the corresponding patient should be investigated.

## 10 REFERENCE VALUES

### Clostridium difficile Toxin A+B

Positive	> Cut-off
Borderline	0.9 x Cut-off – cut-off
Negative	≤ 0.9 x Cut-off

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges as usually done for other diagnostic parameters too. Therefore, the mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

#### 10.1 Test validity

The test run is valid if:

- the mean OD of the negative control is            ≤ 0.20 (manual performance)  
   ≤ 0.30 (automatic performance)
- the mean OD of the positive control is            ≥ 1.00

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is followed correctly (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

#### 10.2 Limitations of the procedure

There is no correlation between measured absorbance and seriousness of the infection. It is also not allowed to correlate absorbances of the samples with that of the positive control.

Cross contamination of reagents and samples can produce false positive results. Incorrect dilutions, not sufficiently homogenized samples or solid particles after centrifugation of the suspension can cause false negative as well as false positive results. Fermented samples with pH values below 5 after resuspension may produce false negative results.

Formalin treated samples may cause false positive results.

A negative test result in the Clostridium difficile Toxin A+B ELISA does not exclude an infection:

The overall interpretation of the ELISA results should always consider the microbiological examination as well as clinical findings.

#### 10.3 Automatic Processing

Performing the *Clostridium difficile Toxin A+B ELISA* on fully automated microplate processors (e.g. DS2, DSX ) may cause elevated absorbances in comparison to the manual procedure due to individual differences concerning wash procedures and general technical specifications of the equipment. In these cases a maximum value of 0.3 absorbance units is permissible for the negative control.

It is recommended to use a wash procedure including 10 seconds soak time per strip and wash step followed by a wash step with distilled or deionized water with 10 seconds of soak time after the final wash step of each wash cycle. If necessary the number of washing steps can be enhanced from 5x to 7x-8x.

**Correlation:**Manual – automatic processing

A panel of 125 stool specimens was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with  $r = 0.976$ .

**11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS****11.1 Precision**

Intra-assay coefficient of variation (CV) in the *Clostridium difficile* Toxin A+B Ag ELISA calculated from 8fold determination of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
I	1.386	0.042	3.0
II	0.506	0.017	3.3
III	0.332	0.028	8.5

Inter-assay coefficient of variation (CV) in the *Clostridium difficile* Toxin A+B Ag ELISA in 5 different test runs on 2 different days from 8fold determination of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
I	1.321	0.102	7.7
II	0.485	0.034	6.9
III	0.345	0.037	10.8

**11.2 Specificity and Sensitivity**

A total of 154 stool specimens were tested in parallel with the *Clostridium difficile* Toxin A+B Ag ELISA and another commercially available ELISA.

	comparative ELISA positive	comparative ELISA negative
DRG ELISA positive	103	4
DRG ELISA negative	2	45

Specificity: 91.8 %

Sensitivity: 98.0 %

**11.3 Cross reactivity**

Faecal samples positive for one of the following intestinal bacteria did not show any cross reaction in the *Clostridium difficile* Toxin A+B Ag ELISA:

*Staphylococcus aureus*, enterotoxin negative;

*Staphylococcus aureus*, enterotoxin positive;

EHEC; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella typhimurium*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec.* *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas caviae*; *Campylobacter spec.*; *Hafnia alvei*; *Yersinia enterocolitica* O:3.

Negative stool specimens have been spiked with  $\geq 10^8$  colony forming units of the following microorganisms and tested negative with the ELISA (OD 450/620 nm < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)



Citrobacter freundii	(ATCC 8090)
Clostridium sordellii	(ATCC 9714)
Enterobacter aerogenes	(ATCC 13048)
Enterobacter cloacae	(ATCC 13047)
Enterococcus faecalis	(ATCC 29212)
Escherichia coli	(ATCC 25922)
Klebsiella pneumoniae	(ATCC 13883)
Peptostreptococcus anaerobius	(ATCC 27337)
Proteus vulgaris	(ATCC 8427)
Pseudomonas aeruginosa	(ATCC 10145)
Salmonella enterica Serovar enteritidis	(ATCC 13076)
Salmonella enterica Serovar typhimurium	(ATCC 14028)
Shigella flexneri	(ATCC 12022)
Shigella sonnei	(ATCC 25931)
Staphylococcus aureus	(ATCC 25923)
Staphylococcus epidermidis	(ATCC 12228)
Vibrio parahaemolyticus	(ATCC 17802)

The *C. sordellii* strain ATCC 9714 did not cross react in the Clostridium difficile Toxin A+B ELISA although some publications describe cross reactivities of toxins of some *C. sordellii* strains with anti- *C. difficile* toxin antibodies.

## 12 COMMON ADVICES AND PRECAUTIONS

**This kit is for in vitro use only.** Follow the working instructions carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. Do not use reagents from damaged packages or bottles. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed.

**Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution.**

**The sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution are universally applicable for the following DRG stool ELISAs: Adenovirus Ag ELISA (EIA 4451), Rotavirus Ag ELISA (EIA-4455), Astrovirus Ag ELISA (EIA-4456), Norovirus ELISA (EIA-5694), Clostridium difficile Toxin A+B Ag ELISA (EIA-4448), Entamoeba histolytica Ag ELISA (EIA-4454) and Giardia lamblia Ag ELISA (EIA-4453).**

Do not use reagents from other manufacturers.

Avoid time shift during dispensing of reagents.

All reagents should be kept at 2 °C - 8 °C before use.

Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes.

Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should generally be observed:

- Do not smoke, eat or drink while handling kit material.
- Always use protective gloves.
- Never pipette material by mouth.
- Note safety precautions of the single test components.

## 1 EINFÜHRUNG

Clostridium difficile gilt als der kausale Auslöser nosokomialer Diarrhoen bei Erwachsenen während oder nach einer Antibiotikabehandlung, insbesondere mit Cephalosporinen der dritten Generation (1). Obwohl 2-3% gesunder Erwachsener und 20 – 50 % gesunder Kinder mit Clostridium difficile besiedelt sind, erfolgt eine Infektion in der überwiegenden Zahl der Fälle über exogene Quellen, wie z. B. Krankenhauspersonal oder durch C. difficile Sporen kontaminierte Gegenstände (Toiletten, Bettwäsche, etc.).

Die beiden Exotoxine A und B dieses anaeroben, sporenbildenden Bakteriums verursachen die Depolymerisation von Aktin-Filamenten durch intrazelluläre enzymatische Modifikation von rho-Proteinen. Die Folge ist eine erhöhte Zellpermeabilität mit Invasion von Neutrophilen, was schließlich zur Ausprägung des klinischen Bildes der so genannten Antibiotika assoziierten Diarrhoe, der Antibiotika assoziierten Colitis (AAC) bis hin zur pseudomembranösen Colitis (PMC) führen kann (1).

Aufgrund des kausalen Zusammenhangs zwischen Toxinproduktion und Erkrankung erfolgt die Diagnostik einer Clostridium difficile Infektion vorwiegend über den direkten Toxinnachweis aus Stuhlproben. Dabei haben immunologische Verfahren, wie z. B. Enzymimmunoassays, die beide Toxine nachweisen können, den als Goldstandard geltenden Cytotoxizitätstest inzwischen weitgehend abgelöst (2).

### Literatur:

1. Rambaud J-C., LaMont J-T. (Hrsg.): „Ökosystem Darm Special- Updates on Clostridium difficile“ Springer Verlag 1995
2. Wilkins T.D. and Lyerly D.M. (2003): „Clostridium difficile Testing: after 20 Years, Still Challenging“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 41, No. 2, p. 531-534

## 2 ANWENDUNGSBEREICH

Der **Clostridium difficile Toxin A+B Ag ELISA** ist ein in vitro Diagnostikum zum direkten Nachweis der Toxine A und B von Clostridium difficile in Stuhlproben und Kultursuspensionen.

## 3 TESTPRINZIP

Der *Clostridium difficile Toxin A+B ELISA* ist ein indirekter Zwei-Seiten-Assay auf der Basis polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen die Toxine A und B von Clostridium difficile.

Verdünnte unbehandelte Stuhlproben oder Kultursuspensionen sowie negative und positive Kontrollproben werden in die mit monoklonalen anti-Toxin A- und polyklonalen anti-Toxin B-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert.

Nach der Inkubation werden die ungebundenen Komponenten durch einen Waschschrift entfernt und biotinylierte, polyklonale anti-Toxin A- und monoklonale anti-Toxin B-Antikörper in die Kavitäten dispensiert. Nach erneuter Inkubation werden die ungebundenen biotinylierten Antikörper in einem Waschschrift entfernt. Die gebundenen biotinylierten Antikörper reagieren in einem weiteren Inkubationsschritt mit Streptavidin-Peroxidase (POD)-Konjugat.

Nach erneutem Waschen setzt die POD im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Endprodukt um. Diese Reaktion wird nach der Inkubation durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt.

Die bei 450 nm /  $\geq$  620 nm gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Toxin-Antigene direkt proportional.

## 4 TESTKOMPONENTEN

Für 96 Kavitäten

1	<b>WELLS</b>	<b>Mikrotiterplatte</b> beschichtet mit monoklonalen anti-Toxin A- (Maus) und polyklonalen anti-Toxin B-Antikörpern (Kaninchen)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung rot vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	<b>WASHBUF CONC 10x</b>	<b>Waschpuffer</b> 10-fach	100 mL Konzentrat für 1000 mL Lösung weiße Kappe
3	<b>DIL</b>	<b>Verdünnungsmedium</b>	100 mL · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe
4	<b>CONTROL +</b>	<b>Positive Kontrolle</b> <i>C. difficile</i> Toxin reaktive Probe	2,0 mL · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	<b>CONTROL -</b>	<b>Negative Kontrolle</b> <i>C. difficile</i> Toxin negative Probe	2,0 mL · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6/1	<b>CONJ BIOTIN</b>	<b>Biotin-Konjugat</b> Biotinylierte, polyklonale anti-Toxin A- (Kaninchen) und monoklonale anti-Toxin B-Antikörper (Maus)	15 mL · gebrauchsfertig grün gefärbt weiße Kappe
6/2	<b>CONJ STREPT</b>	<b>Streptavidin- POD-Konjugat</b>	15 mL · gebrauchsfertig rot gefärbt braune Kappe
7	<b>SUBSTR TMB</b>	<b>Substrat</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 mL · gebrauchsfertig blaue Kappe
8	<b>STOP</b>	<b>Stopplösung</b> 0,25 M Schwefelsäure	15 mL · gebrauchsfertig gelbe Kappe

## 5 VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER PROBEN

### 5.1 Testansatz aus Stuhlsuspensionen

#### Gewinnung und Lagerung

Stuhlproben sollten sofort nach der Entnahme bei 2 °C - 8 °C gelagert und innerhalb von 72 h untersucht werden, oder bei -80 °C eingefroren werden. Eine Lagerung bei -20 °C ist aufgrund der Gefahr des Toxinabbaus ebenso wenig zu empfehlen wie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

Formalin behandelte Stuhlproben sollten nicht verwendet werden.

Stuhlproben, die bereits im Verdünnungsmedium entsprechend Testanleitung verdünnt wurden, können bis zu 72 h bei 2 °C - 8 °C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

#### Vorbereitung und Verwendung

Stuhlproben gut durchmischen. In ein Reaktionsgefäß **1000 µL** Verdünnungsmedium pipettieren. Bei festen oder halbfesten Stuhlproben **200 mg** (Durchmesser etwa 4 - 6 mm) mit einem Einmalstäbchen, bei flüssigen Stuhlproben **200 µL** in das Probenverdünnungsmedium überführen und sorgfältig mischen.

Gegebenenfalls Schwebeteilchen durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge 1 min bei maximaler Drehzahl sedimentieren.

### 5.2 Testansatz aus Kultursuspensionen (toxigene Kultur)

Über 48 h auf Blut- oder CCFA-Agar gewachsene *Clostridium difficile* Kolonien können direkt im ELISA auf Toxin A+B untersucht werden. Hierzu ist eine Bakteriensuspension herzustellen, deren Dichte Mc Farland Standard 1 entspricht (OD bei 600 nm = 0,2 bis 0,25 nach Nullabgleich gegen das gelbe Verdünnungsmedium):

In ein Reaktionsgefäß **1000 µL** Verdünnungsmedium pipettieren.

**2 - 4 Impfösen** *C. difficile* Kolonien abnehmen und in das Verdünnungsmedium einrühren.

Probe durch kräftiges Schütteln auf einem Vortex-Gerät resuspendieren, ggf. Bakteriendichte durch Trübungsmessung bei 600 nm prüfen (s.o.).

100 µL der Suspension direkt im ELISA einsetzen.

Bei Verwendung von Selektivmedien kann die nachweisbare Toxinmenge in Abhängigkeit von den in diesen Medien enthaltenen Hemmstoffen reduziert sein, was zu (im Vergleich zu Vollmedien) verringerten OD-Werten im ELISA führen kann. Bei toxigener Kultur von Selektivmedien muss daher auf Einsatz einer ausreichend hohen Bakteriendichte geachtet werden, die mindestens Mc Farland Standard 4 (OD 600 nm > 1,0 nach Nullabgleich gegen das gelbe Verdünnungsmedium) entspricht. Zum Erreichen dieser Bakteriendichte ist die Resuspendierung der *C. difficile* Kolonien von mindestens einer halben, dicht bewachsenen Platte erforderlich.

Gegebenenfalls ist den Empfehlungen und Angaben der Medium-Hersteller zu folgen, die Angaben zum Einfluss der in den entsprechenden Medien verwendeten Zusätze auf die Toxinproduktion und damit zur prinzipiellen Eignung eines Mediums für die toxigene Kultur machen können.

## 6 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN UND HILFSMITTEL

- Verstellbare Einkanal-Mikropipette, 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen
- 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät oder 8-Kanalpipette
- Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Teströhrchen (2 mL) für die Probenverdünnung
- Horizontalschüttler bei Abarbeitung nach Variante 2

## 7 VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

### 7.1 Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen.

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2 °C - 8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2 °C - 8 °C mindestens 2 Monate haltbar.

Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei 2 °C - 8 °C mindestens 1 Monat verwendbar.

### 7.2 Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Strips ist in einem aluminium-beschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen.

Waschpufferkonzentrat 10fach (1 + 9) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 mL Waschpufferkonzentrat + 90 mL destilliertes Wasser.

## 8 TESTDURCHFÜHRUNG

Der *Clostridium difficile* Toxin A+B ELISA kann in zwei Varianten abgearbeitet werden:

1. Variante: Inkubation ohne Schütteln; Gesamtinkubationsdauer 2 Stunden 15 Minuten
  2. Variante: Inkubation mit Schütteln; Gesamtinkubationsdauer 1 Stunde 15 Minuten
- Stuhlproben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 6 (w/v) verdünnen, z.B. 200 mg Stuhlprobe + 1,0 mL Verdünnungsmedium, bzw. 2-4 Impfösen einer *C. difficile* Kultur in 1,0 mL Verdünnungsmedium (3) resuspendieren.
  - Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.
  - Beim Waschvorgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen (s. Empfehlungen für automatische Abarbeitung)
  - Substrat vor Licht geschützt aufbewahren.

**8.1 Arbeitsschritte Variante 1 (ohne Schütteln)**

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je **100 µL CONTROL +** Positive Kontrolle (4)  
**100 µL CONTROL –** Negative Kontrolle (5)  
**100 µL verdünnte Stuhlprobe oder Kultursuspension** pipettieren.
3. Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
4. Dekantieren und **5-mal mit 300 µL** Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. **3 Tropfen (oder 120 µL) CONJ BIOTIN** Biotin-Konjugat (6/1) pro Kavität.
6. Platte abkleben und 30 min bei RT inkubieren.
7. Dekantieren und **5-mal mit 300 µL** Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. **3 Tropfen (oder 120 µL) CONJ STREPT** Streptavidin-POD-Konjugat (6/2) pro Kavität.
9. Platte abkleben und 30 min bei RT inkubieren.
10. Dekantieren und **5-mal mit 300 µL** Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
11. **3 Tropfen (oder 120 µL) SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
12. 15 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
13. **3 Tropfen (oder 120 µL) STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
14. Messen der OD bei 450 nm /  $\geq$  620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

**8.2 Arbeitsschritte Variante 2 (mit Schütteln)**

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je **100 µL CONTROL +** Positive Kontrolle (4)  
**100 µL CONTROL –** Negative Kontrolle (5)  
**100 µL verdünnte Stuhlprobe oder Kultursuspension** pipettieren.
3. Platte abkleben und 30 Minuten bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 - 700/min inkubieren.
4. Dekantieren und **5-mal mit 300 µL** Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. **3 Tropfen (oder 120 µL) CONJ BIOTIN** Biotin-Konjugat (6/1) pro Kavität.
6. Platte abkleben und 15 Minuten bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 - 700/min inkubieren.
7. Dekantieren und **5-mal mit 300 µL** Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. **3 Tropfen (oder 120 µL) CONJ STREPT** Streptavidin-POD-Konjugat (6/2) pro Kavität.
9. Platte abkleben und 15 Minuten bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 - 700/min inkubieren.
10. Dekantieren und **5-mal mit 300 µL** Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
11. **3 Tropfen (oder 120 µL) SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
12. 15 min lichtgeschützt bei RT inkubieren (nicht schütteln).
13. **3 Tropfen (oder 120 µL) STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
14. Messen der OD bei 450 nm /  $\geq$  620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

## 9 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

### Qualitative Evaluierung

**Cut-off Bestimmung: OD Negative Kontrolle + 0,20**

Proben mit OD Werten, die über der errechneten Grenzwert OD liegen, sind als **reaktiv**,

Proben mit einer OD, die mehr als 10 % unter der errechneten Grenzwert-OD liegen, sind als **nicht reaktiv** zu bewerten.

Proben mit OD, die innerhalb von 10 % unterhalb der errechneten Grenzwert-OD liegen, sind als **grenzwertig** zu beurteilen und müssen wiederholt getestet werden. Gegebenenfalls ist eine zweite Stuhlprobe der entsprechenden Patienten anzufordern.

## 10 REFERENZWERTE

### Clostridium difficile

Positiv	> Cut-off
Grenzwertig	Cut-off x 0,9 – cut-off
Negativ	≤ Cut-off x 0,9

Aufgrund von Unterschieden in der Population wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen pathologischen und normalen Referenzbereiche bestimmen sollte.

Oben genannte Werte sind deshalb nur als Empfehlung zu werten.

### 10.1 Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- OD-Mittelwert der Negativen Kontrolle ≤ 0,20 (manuelle Abarbeitung)  
≤ 0,30 (automatische Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der Positiven Kontrolle ≥ 1,00

Sind die o. g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

### 10.2 Grenzen der Methode

Der qualitative enzymimmunologische Nachweis der Toxine A und B von Clostridium difficile in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu.

Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle in Korrelation gesetzt werden.

Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu falschen Ergebnissen führen. Unkorrekte Verdünnung, ungenügende Homogenisierung der Proben sowie nicht sedimentierte Festbestandteile in zentrifugierten Proben können sowohl zu falsch positiven als auch zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Formalin behandelte Proben können falsch positive Werte hervorrufen.

Ein negatives Ergebnis im Clostridium difficile Toxin A+B Ag ELISA schließt eine Infektion nicht aus:

Die Gesamtinterpretation des ELISA-Testergebnisses sollte im Zusammenhang mit dem Erregernachweis und der Klinik erfolgen.

### 10.3 Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Clostridium difficile* Toxin A+B ELISA auf einem Mikrotitrationsplatten-Vollautomaten (wie z.B. DS2, DSX) können in Abhängigkeit vom verwendeten Gerät und von den individuellen Geräteeinstellungen im Vergleich zur manuellen Bearbeitung höhere OD-Werte gemessen werden. In diesen Fällen ist die Erhöhung des max. zulässigen Grenzwertes für die OD der Negativ-Kontrolle auf 0,3 zulässig.

Für den Waschprozess ist die Einprogrammierung von Waschpuffer-Einwirkzeiten (mind. 10 sec pro Streifen und Waschschrift) gefolgt von einem Waschschrift mit destilliertem oder demineralisiertem Wasser und 10 sec Einwirkzeit zu empfehlen. Gegebenenfalls kann die Anzahl der Waschschriffe von 5x auf 7x bis 8x erhöht werden.

**Korrelation:****manuelle – automatische Abarbeitung**

Die Untersuchung von 125 Stuhlproben zeigte bei parallel durchgeführter manueller und automatischer Abarbeitung (DS2 Dynex Technologies) eine sehr gute Übereinstimmung (Korrelationskoeffizient  $r = 0,976$ )

**11 LEISTUNGSMERKMALE****11.1 Präzision**

Intra-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Clostridium difficile* Toxin A+B Ag ELISA aus 8-fach-Bestimmung von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
I	1,386	0,042	3,0
II	0,506	0,017	3,3
III	0,332	0,028	8,5

Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Clostridium difficile* Toxin A+B Ag ELISA aus 5 unterschiedlichen Testläufen an zwei verschiedenen Tagen aus 8fach-Bestimmung von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
I	1,321	0,102	7,7
II	0,485	0,034	6,9
III	0,345	0,037	10,8

**11.2 Spezifität und Sensitivität**

Im Rahmen einer Studie wurden insgesamt 154 Stuhlproben parallel im *Clostridium difficile* Toxin A+B Ag ELISA und einem anderen kommerziellen ELISA untersucht.

	Vergleichs ELISA positiv	Vergleichs ELISA negativ
DRG ELISA positiv	103	4
DRG ELISA negativ	2	45

Spezifität: 91,8 %

Sensitivität: 98,0 %

**11.3 Kreuzreaktivität**

Die Untersuchung von Stuhlproben mit einem positiven Erregernachweis der folgenden Bakterien-Spezies ergab keine falsch positiven Ergebnisse im *Clostridium difficile* Toxin A+B Ag ELISA:

*Staphylococcus aureus*, nicht Enterotoxin bildend; *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin bildend; EHEC; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella typhimurium*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec.* *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas caviae*; *Campylobacter spec.*; *Hafnia alvei*; *Yersinia enterocolitica* O:3.

Negative Stuhlsuspensionen wurden mit folgenden Mikroorganismen mit einer Keimzahl von  $\geq 10^8$  Kolonie bildenden Einheiten pro mL aufgestockt und im ELISA negativ getestet

(OD450/620nm < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)
<i>Clostridium sordellii</i>	(ATCC 9714)

Enterobacter aerogenes	(ATCC 13048)
Enterobacter cloacae	(ATCC 13047)
Enterococcus faecalis	(ATCC 29212)
Escherichia coli	(ATCC 25922)
Klebsiella pneumoniae	(ATCC 13883)
Peptostreptococcus anaerobius	(ATCC 27337)
Proteus vulgaris	(ATCC 8427)
Pseudomonas aeruginosa	(ATCC 10145)
Salmonella enterica Serovar enteritidis	(ATCC 13076)
Salmonella enterica Serovar typhimurium	(ATCC 14028)
Shigella flexneri	(ATCC 12022)
Shigella sonnei	(ATCC 25931)
Staphylococcus aureus	(ATCC 25923)
Staphylococcus epidermidis	(ATCC 12228)
Vibrio parahaemolyticus	(ATCC 17802)

Der getestete Stamm von *Clostridium sordellii* (ATCC 9714) zeigte keine Kreuzreaktivität im Clostridium difficile Toxin A+B ELISA. In der Literatur sind Kreuzreaktivitäten von anti-C. difficile Toxin Antikörpern mit *C. sordellii* Toxinen bestimmter Stämme beschrieben.

## 12 ALLGEMEINE HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Dieses Testbesteck ist nur zum in vitro-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Mikrotiterplatten und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten.

Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden.

**Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt.**

**Ausnahme: Verdünnungsmedium, Waschpuffer, TMB/Substratlösung und Stopplösung.**

**Das Verdünnungsmedium, der Waschpuffer, die TMB/Substratlösung und Stopplösung können darüber hinaus Parameter-übergreifend für die DRG-Stuhl-ELISAs**

**Adenovirus Ag ELISA (EIA-4451), Rotavirus Ag ELISA (EIA-4455), Astrovirus Ag ELISA (EIA-4456), Norovirus ELISA (EIA-5694), Clostridium difficile Toxin A+B Ag ELISA (EIA-4448), Entamoeba histolytica Ag ELISA (EIA-4454) und Giardia lamblia Ag ELISA (EIA-4453) eingesetzt werden.**

Dies gilt auch für die Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller zur Komplettierung eines geöffneten Testbestecks.

Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.

Die empfohlene Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2 °C - 8 °C.

Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

- Nicht essen, trinken oder rauchen!
- Nie mit dem Mund pipettieren!
- Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!
- Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!



## 1 INTRODUZIONE

Il *Clostridium difficile* è un batterio causa di diarree nosocomiali negli adulti durante o dopo terapie con antibiotici come la 3° generazione di cefalosporine (1). Dato che il 2-3% della popolazione adulta sana e il 20-50% dei bambini sani sono portatori del *Clostridium difficile*, l'infezione è normalmente esogena e si trasmette per contatto col personale medico o con le spore del *Clostridium difficile* che possono contaminare bagni, biancheria ecc.

Entrambe le tossine A e B di questo batterio sporifero causano la depolimerizzazione dei filamenti di actina a causa della modificazione enzimatica intracellulare delle proteine rho. Di conseguenza la permeabilità della membrana cellulare aumenta e i neutrofili possono entrare fino a condurre alle manifestazioni cliniche denominate diarree associate a *Clostridium difficile* e coliti o anche coliti pseudomembranose (PMC) (1).

Essendo la malattia correlata alla produzione di tossina, la diagnosi di infezione da *Clostridium difficile* si basa sulla ricerca diretta delle tossine nei campioni fecali. Attualmente il test di citotossicità è stato considerato come modello ideale per la determinazione delle tossine del *Clostridium difficile*. Di recente è stato rimpiazzato in larga parte dai test immunologici come quelli immunoenzimatici. (2).

### Riferimenti:

1. Rambaud J-C., LaMont J-T. (Hrsg.): "Ökosystem Darm Special- Updates on *Clostridium difficile*" Springer Verlag 1995
2. Wilkins T.D. and Lysterly D.M. (2003): „*Clostridium difficile* Testing: after 20 Years, Still Challenging“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 41, No. 2, p. 531-534

## 2 INDICAZIONI

Il test ***Clostridium difficile* Toxin A+B Ag ELISA** è uno strumento diagnostico per la ricerca in vitro delle tossine A e B del *Clostridium difficile* nei campioni fecali e nelle colture in sospensione.

## 3 PRINCIPIO DEL TEST

Il test *Clostridium difficile* Toxin A + B ELISA è un test immunologico bilaterale indiretto per la determinazione di entrambe le tossine A e B del *Clostridium difficile* con anticorpi monoclonali e policlonali.

Le tossine del *Clostridium difficile* del campione fecale o della coltura in sospensione reagiscono con le anticorpi monoclonali anti-tossina A e anticorpi policlonali B contenuti nella fase solida delle micropiastre. Dopo l'incubazione la parte non legata viene rimossa con un passaggio di lavaggio.

Successivamente le tossine legate reagiscono specificamente con gli anticorpi policlonali biotilinati anti-tossina A e monoclonali anti-tossina B durante un secondo periodo di incubazione. Il materiale non legato viene separato dal complesso immunologico su fase solida da un'ulteriore fase di lavaggio.

Durante la prossima incubazione il tracciante enzimatico di perossidasi di rafano (HRP) coniugato con la streptavidina reagisce con gli anticorpi biotilinati legati. I coniugati non legati sono rimossi con un lavaggio.

L'HRP trasforma la soluzione incolore di substrato di 3,3',5,5'-tetra-methylbenzidine (TMB) successivamente aggiunta in un prodotto blu. La reazione enzimatica termina con l'aggiunta di acido solforico nei pozzetti che vira la soluzione dal blu al giallo.

La densità ottica (OD) della soluzione letta a 450/620 nm è direttamente proporzionale alla quantità specifica delle tossine A e B del *Clostridium difficile*.

Dopo aver stabilito il valore cut-off, i risultati sono interpretati come positivi o negativi.

**4 CONTENUTO DEL TEST PER 96 POZZETTI**

1	<b>WELLS</b>	<b>Piastra micropozzetti</b> rivestiti con anticorpi monoclonali (topo) anti-Tossina A e anticorpi policlonali (coniglio) anti-Tossina B	12 strisce separabili di 8 pozzetti Marcatura colore rosso sigillato vuoto con materiale essicante
2	<b>WASHBUF CONC 10x</b>	<b>Tampone di lavaggio concentrato</b> 10x	100 mL concentrato per 1000 mL di soluzione tappo bianco
3	<b>DIL</b>	<b>Diluyente per campioni</b>	100 mL · pronto all'uso colore giallo tappo nero
4	<b>CONTROL +</b>	<b>Controllo positivo</b> Campione reagente al C. difficile tossina	2.0 mL · pronto all'uso colore blu tappo rosso
5	<b>CONTROL -</b>	<b>Negative control</b> Campione negativo al C. difficile tossina	2.0 mL · pronto all'uso colore blu tappo verde
6/1	<b>CONJ BIOTIN</b>	<b>Biotina coniugata</b> Anticorpi anti-Tossina A policlonali (coniglio) e anti-Tossina B monoclonali (topo); biotilinati	15 mL · pronto all'uso colore verde tappo bianco
6/2	<b>CONJ STREPT</b>	<b>Streptavidin-HRP-coniugato, tracciante</b>	15 mL · pronto all'uso colore rosso tappo marrone
7	<b>SUBSTR TMB</b>	<b>Soluzione di substrato,</b> 3,3',5,5'-benzidine tetrametilico e perossido di idrogeno	15 mL · pronto all'uso tappo blu
8	<b>STOP</b>	<b>Soluzione arresto</b> 0.25 M Acido solforico	15 mL · pronto all'uso tappo giallo

**5 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI****5.1 Determinazione della tossina nei campioni fecali****Raccolta e conservazione**

I campioni fecali devono essere conservati a 2 °C - 8 °C immediatamente dopo la raccolta e esaminati entro 72 ore.

Se necessario congelare i campioni a -80 °C. La conservazione a -20 °C come i ripetuti congelamenti e scongelamenti devono essere evitati.

Non usare campioni conservati in formalina.

Campioni fecali già diluiti con il diluyente dei campioni possono essere conservati entro 72 ore a 2 °C - 8 °C e possono essere analizzati il giorno seguente.

**Preparazione**

Pemettere ai campioni di raggiungere la temperatura ambiente e mescolarli con cura.

Porre in una provetta pulita **1000 µL** di soluzione diluyente.

Cou una idonea bacchetta porre circa **200 mg** (2-3 mm di diametro) di feci se sono solide o, con una pipetta, **200 µL** se liquide nella provetta e mescolare con cura.

Se necessario, far sedimentare particelle sospese tramite centrifugazione a massima rotazione per 1 min.

**5.2 Determinazione della tossina nella coltura in sospensione (coltura toxogenica)**

Le colonie di Clostridium difficile cresciuti sul sangue o su agar CCFA in condizioni anaerobiche per 48 ore possono essere esaminati direttamente col test Clostridium difficile Toxin A+B ELISA:

Preparare una sospensione batterica uguale allo standard 1 di Mc Farland (valore OD a 600 nm: 0.2 - 0.25 dopo la compensazione a zero del diluente dei campioni colorato giallo):

Trasferire con la pipetta **1000 µL** del diluente per campioni in una provetta pulita.

Trasferire **2-4 anse d'inoculazione** di Clostridium difficile nel diluente per campioni e mescolare su un vortex. Leggere il valore OD a 600 nm come descritto sopra dove richiesto.

Usare 100 µL per il test ELISA.

Se si usa un medio selettivo di coltura, la quantità rilevabile di tossina può essere ridotto a causa della presenza di componenti inibitorie di tale medio, risultando in valori OD ridotti nell'ELISA. Pertanto l'uso di medi selettivi per colture tossigeniche richiede la preparazione di una sospensione batterica uguale allo standard 4 di Mc Farland (OD 600 nm > 1.0 dopo la compensazione a zero del diluente dei campioni colorato giallo). In questo caso le colonie di Clostridium difficile di almeno una piastra densamente popolata devono essere raccolte. Dove richiesto, le raccomandazioni e le istruzioni del produttore del medio devono essere osservati.

## 6 MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Micropipette
- Pipette multicanale
- Contenitore del reagente per pipette multicanale
- Sistema di lavaggio a 8 canali con pompa a vuoto e bottiglia per i residui o sistema di lavaggio piastra automatico o pipette da 8 canali.
- Lettore di micropiastre con filtri ottici a 450 nm per la misurazione e  $\geq 620$  nm di riferimento.
- Acqua distillata o deionizzata
- Vetrie
- Provette (2 mL) per la preparazione dei campioni
- Agitatore orbitale per l'esecuzione della variante 2 del test

## 7 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

### 7.1 Dimensioni del kit e scadenza

Ogni kit è progettato per svolgere 96 test.

La data di scadenza di ogni componente è stampata sulla sua etichetta, e quella dell'intero kit sulla etichetta esterna alla confezione.

Appena ricevuto, tutti i componenti devono essere mantenuti a 2 °C - 8 °C, preferibilmente nella confezione originale.

Una volta aperto il kit tutti i componenti sono stabili per almeno due mesi, se ben conservati.

La soluzione di lavaggio è stabile per almeno un mese se conservata a 2 °C - 8 °C.

### 7.2 Preparazione dei reagenti

Permettere a tutti i componenti di raggiungere la temperatura ambiente prima dell'uso.

La piastra microtitration è sigillata vuota in un involucro con materiale essiccante. La piastra si compone di un telaio e striscie di pozzetti separabili. Attendere il raggiungimento della temperatura ambiente prima di aprire la confezione. I pozzetti inutilizzati devono essere conservati al freddo e protetti dalla polvere nella confezione originale risigillata con cura.

Preparare una quantità sufficiente di soluzione di lavaggio diluendo il *Tampone di lavaggio 10 volte (1 + 9)* con acqua distillata o deionizzata.

Per esempio: 10 mL di *tampone di lavaggio* concentrato + 90 mL di acqua distillata.

## 8 PROCEDURA DEL TEST

Il test *Clostridium difficile Toxin A+B ELISA* può essere svolto in due modi:

1. Incubazione senza agitazione; la durata totale del test è di 2 ore e 15 minuti
  2. Incubazione con agitazione; la durata totale del test è di 1 ore e 15 minuti
- o Diluire i campioni col diluente per campioni (3) 1: 6, es. 200 mg o 200 µL di feci + 1,0 mL di diluente per campioni (3) o  
Trasferire 2-4 anse di inoculazione da una colonia di C. difficile in una provetta con 1,0 mL di diluente per campioni (3) e mescolare su un vortex.
  - o Evitare perdita di tempo durante l'aggiunta dei reagenti e dei campioni.
  - o Assicurarsi che il tempo di permanenza nei pozzetti durante il lavaggio sia di almeno 5 secondi per ciclo.
  - o Evitare l'esposizione diretta alla luce del substrato TMB!

**8.1 Procedimento per la Variante 1: senza agitazione**

1. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (TA) prima dell'utilizzo. Mescolare delicatamente senza produrre schiuma.
2. Pipettare: **100 µL di Soluzione per il controllo positivo**  
**100 µL di Soluzione per il controllo negativo**  
**100 µL** di campione fecale diluito o di coltura in sospensione
3. Coprire la piastra e incubare per **60 min** a TA.
4. Lasciare decantare, poi lavare ogni pozzetto **5x** con **300 µL** di soluzione per lavaggio (diluita).
5. Distribuire **3 gocce** (o **120 µL**) di **Biotina Coniugata** per pozzetto
6. Coprire la piastra e incubare per **30 min** a TA.
7. Lasciare decantare, poi lavare ogni pozzetto **5x** con **300 µL** di soluzione per lavaggio (diluita).
8. Distribuire **3 gocce** (o **120 µL**) di **Streptavidin Conjugate** per pozzetto.
9. Coprire la piastra e incubare per **30 min** a TA.
10. Lasciare decantare, poi lavare ogni pozzetto **5x** con **300 µL** di soluzione per lavaggio (diluita).
11. Distribuire **3 gocce** (o **120 µL**) di **Soluzione di substrato** per pozzetto.
12. Incubare **15 min** a TA proteggendo dalla luce.
13. Distribuire **3 gocce** (o **120 µL**) di **Soluzione di arresto**, agitare delicatamente.
14. Leggere i valori OD a 450 nm (filtro di riferimento  $\geq 620$  nm) con un lettore di micropiastre entro 30 minuti dall'arresto della reazione.

**8.2 Procedimento per la Variante 2: con agitazione**

1. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (TA) prima dell'utilizzo. Mescolare delicatamente senza produrre schiuma.
2. Aggiungere: **100 µL di Soluzione per il controllo positivo**  
**100 µL di Soluzione per il controllo negativo**  
**100 µL** di campione fecale diluito o di coltura in sospensione
3. Coprire la piastra e incubare per **30 min** a TA in un agitatore orbitale con frequenza di 500 - 700/min
4. Lasciare decantare, poi lavare ogni pozzetto **5x** con **300 µL** di soluzione per lavaggio (diluita).
5. Distribuire **3 gocce** (o **120 µL**) di **Biotina Coniugata** per pozzetto
6. Coprire la piastra e incubare per **15 min** a TA in un agitatore orbitale con frequenza di 500 - 700/min
7. Lasciare decantare, poi lavare ogni pozzetto **5x** con **300 µL** di soluzione per lavaggio (diluita).
8. Distribuire **3 gocce** (o **120 µL**) di **Coniugato di Streptavidina** per pozzetto.
9. Coprire la piastra e incubare per **15 min** a TA in un agitatore orbitale con frequenza di 500 - 700/min.
10. Lasciare decantare, poi lavare ogni pozzetto **5x** con **300 µL** di soluzione per lavaggio (diluita).
11. Distribuire **3 gocce** (o **120 µL**) di **Soluzione di substrato** per pozzetto.
12. Incubare **15 min** a TA proteggendo dalla luce senza mescolare.
13. Distribuire **3 gocce** (o **120 µL**) di **Soluzione di arresto**, agitare delicatamente.
14. Leggere i valori OD a 450 nm (filtro di riferimento  $\geq 620$  nm) con un lettore di micropiastre entro 30 minuti dall'arresto della reazione.

## 9 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

### Valutazione qualitativa

**Individuazione del Cut-off: controllo negativo OD + 0.20**

I campioni con assorbimento superiore del 10% rispetto al valore cut-off sono considerati **positivi**,

i campioni con assorbimento inferiore del 10% rispetto al valore cut-off sono considerati **negativi** all'antigene della tossina A e B del Clostridium difficile.

I campioni con differenze inferiori del 10% rispetto al valore di cut-off sono considerati borderline e devono essere nuovamente testati. In caso di risultato borderline ripetuto deve essere analizzato un secondo campione dello stesso paziente.

## 10 VALORI DI RIFERIMENTO

### Clostridium difficile Toxin A+B

Positivo	> Cut-off
Borderline	0.9 x Cut-off – cut-off
Negativo	≤ 0.9 x Cut-off

Si raccomanda ad ogni laboratorio di individuare i propri intervalli normali e patologici come per tutti gli altri parametri diagnostici. Pertanto i sopra riportati riferimenti forniscono una guida ai valori attesi.

#### 10.1 Validità del test

Il test svolto è valido se:

- il valore medio OD del controllo di negatività è  $\leq 0.20$  (test svolto manualmente)  
 $\leq 0.30$  (test svolto in automatico)
- il valore medio OD del controllo di positività è  $\geq 1.00$

Se i parametri riportati non vengono raggiunti, ripetere il test assicurandosi che la procedura si svolga correttamente (tempi di incubazione e temperature, diluizione dei campioni e del liquido di lavaggio, fasi di lavaggio ecc.). In caso di ripetuto non raggiungimento di risultati utili contattare il vostro fornitore.

#### 10.2 Limiti del test

Non esiste correlazione tra l'assorbimento misurato e la gravità dell'infezione. L'assorbimento dei campioni non deve essere correlato con il campione di controllo positivo.

La contaminazione incrociata dei campioni e dei reagenti può produrre risultati falsi positivi. La non corretta diluizione, l'insufficiente omogeneizzazione dei campioni o particelle solide dopo la centrifugazione della sospensione può produrre falsi negativi o falsi positivi.

I campioni conservati in formalina possono produrre falsi positivi.

Un risultato negativo al test Clostridium difficile Toxin A+B ELISA non esclude l'infezione.

L'intera interpretazione del risultato del test ELISA deve sempre tener conto degli esami microbiologici e dei risultati clinici.

### 10.3 Procedimento automatizzato

L'esecuzione del test *Clostridium difficile Toxin A+B ELISA* in un processore automatizzato di micropiastre (ad es. DS2, DSX) può comportare assorbimenti elevati rispetto alla procedura manuale dovuti alle diverse procedure di lavaggio e alle specifiche tecniche della macchina. In questo caso per il controllo di negatività è accettato un valore di assorbimento di 0.3 unità.

Si raccomanda adottare una procedura di lavaggio che comprenda 10 secondi di ammollo per striscia seguito dopo l'ultimo lavaggio di ogni ciclo da un lavaggio con almeno 10 secondi con acqua distillata o deionizzata.

Se necessario si può aumentare il numero dei passaggi di lavaggio da 5x a 7x-8x.

#### Correlazione tra procedimento manuale e automatizzato

Un gruppo di 125 campioni fecali è stato esaminato in parallelo con metodo manuale e automatizzato.

E' stata riscontrata una correlazione con  $r = 0.976$

## 11 CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO

### 11.1 Precisione

Coefficiente interno di variazione (CV) nel test *Clostridium difficile Toxin A+B Ag ELISA* :

campione	OD medio	Deviazione standard	CV (%)
I	1.386	0.042	3.0
II	0.506	0.017	3.3
III	0.332	0.028	8.5

Coefficiente interno di variazione nel test *Clostridium difficile Toxin A+B Ag ELISA* ricavato da 5 prove diverse in 2 giorni diversi:

campione	OD medio	Deviazione standard	CV (%)
I	1.321	0.102	7.7
II	0.485	0.034	6.9
III	0.345	0.037	10.8

### 11.2 Specificità e sensibilità

Un gruppo di 154 campioni fecali sono stati testati in parallelo con il test *Clostridium difficile Toxin A+B Ag ELISA* e un altro test commerciale ELISA disponibile.

	ELISA positivi di confronto	ELISA negativi di confronto
DRG ELISA positivi	103	4
DRG ELISA negativi	2	45

Specificità: 91.8 %

Sensibilità: 98.0 %

### 11.3 Reazioni incrociate

I campioni fecali positivi ai seguenti batteri intestinali non hanno mostrato reazioni incrociate con l'uso del test *Clostridium difficile Toxin A+B Ag ELISA*:

*Staphylococcus aureus*, non enterotossico;

*Staphylococcus aureus*, enterotossico;

EHEC; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella typhimurium*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec.* *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas caviae*; *Campylobacter spec.*; *Hafnia alvei*; *Yersinia enterocolitica* O:3.

A campioni fecali negativi sono stati aggiunti  $\geq 10^8$  unità colonie formanti dei seguenti microorganismi e sono testate negative con il test ELISA (OD450/620nm < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)

Bacteroides fragilis	(ATCC 25285)
Candida albicans	(ATCC 10231)
Campylobacter coli	(ATCC 33559)
Campylobacter jejuni	(ATCC 33291)
Citrobacter freundii	(ATCC 8090)
Clostridium sordellii	(ATCC 9714)
Enterobacter aerogenes	(ATCC 13048)
Enterobacter cloacae	(ATCC 13047)
Enterococcus faecalis	(ATCC 29212)
Escherichia coli	(ATCC 25922)
Klebsiella pneumoniae	(ATCC 13883)
Peptostreptococcus anaerobius	(ATCC 27337)
Proteus vulgaris	(ATCC 8427)
Pseudomonas aeruginosa	(ATCC 10145)
Salmonella enterica Serovar enteritidis	(ATCC 13076)
Salmonella enterica Serovar typhimurium	(ATCC 14028)
Shigella flexneri	(ATCC 12022)
Shigella sonnei	(ATCC 25931)
Staphylococcus aureus	(ATCC 25923)
Staphylococcus epidermidis	(ATCC 12228)
Vibrio parahaemolyticus	(ATCC 17802)

Il ceppo *C. sordellii* ATCC 9714 non dava reazioni ad incrocio nel test Clostridium difficile Toxin A+B ELISA, anche se alcune pubblicazioni descrivono reazioni ad incrocio con tossine di alcuni ceppi di *C. sordellii* con anti-*C. difficile* anticorpi.

## 12 PRECAUZIONI E AVVERTENZE

**Questo test è da eseguire solo in vitro.** Seguire attentamente le istruzioni. Il kit deve essere manipolato solo da personale tecnico preparato. Non utilizzare reagenti da confezioni o bottiglie danneggiate.

Devono essere osservate le date di scadenza presenti sulle rispettive etichette.

**Non utilizzare o mescolare reagenti di lotti diversi ad eccezione del diluente per campioni, tampone di lavaggio, TMB/soluzione di substrato e soluzione d'arresto.**

**Il diluente per campione, tampone di lavaggio, TMB Substrato e soluzione d'arresto sono universalmente applicabile ai seguenti prodotti:**

**Adenovirus Ag ELISA (EIA-4451), Rotavirus Ag ELISA (EIA-4455), Astrovirus Ag ELISA (EIA-4456), Norovirus ELISA (EIA-5694), Clostridium difficile Toxin A+B Ag ELISA (EIA-4448), Entamoeba histolytica Ag ELISA (EIA-4454) and Giardia lamblia Ag ELISA (EIA-4453).**

Non usare reagenti prodotti da altri produttori.

Evitare ritardi durante l'aggiunta dei reagenti

Tutti i reagenti devono essere tenuti a 2 °C - 8 °C prima dell'utilizzo.

Alcuni reagenti possono contenere biocidi come conservante. Ulteriori informazioni si trovano nella scheda di dati di sicurezza.

Non devono essere ingeriti o lasciati entrare in contatto con la pelle o le mucose. Maneggiare tutti i componenti e i campioni fecali con estrema attenzione, perché potenzialmente pericolosi.

Proprio per la potenziale pericolosità del materiale contenuto nel kit devono essere osservate le seguenti precauzioni:

- Non fumare, bere o mangiare mentre si maneggia il materiale del kit,
- Usare sempre guanti di protezione,
- Non utilizzare pipette a bocca,
- Tener conto delle avvertenze di ogni singolo componente.

## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Código de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité