



Key Code TSMX7593A
www.oxid.com/ifu

Europe +800 135 79 135 US 1 855 2360 190
CA 1 855 805 8539 ROW +31 20 794 7071

ProSpecT

C. difficile Toxin A/B

Mikrotiterplatten-

Assay

REF R244596 **96** **DE**

1. PANWENDUNGSBEREICH

Beim ProSpecT™ *Clostridium difficile* Toxin A/B-Mikrotiterplatten-Assay handelt es sich um einen qualitativen Enzymimmunoassay (EIA) für den Nachweis von *C. difficile*-Toxin A und B in humanen Stuhlproben von Patienten, bei denen eine *Clostridium difficile*-Erkrankung vermutet wird. Der Test ist zur Unterstützung der Diagnose von *Clostridium difficile*assozierten Erkrankungen (CDAD) vorgesehen.

2. ZUSAMMENFASSUNG

Clostridium difficile ist ein grampositives, anaerobes, sporenbildendes Bakterium, bei dem es sich um den am häufigsten nachweisbaren Erreger der antibiotika-assoziierten Diarrhö handelt^{1,2}. Die Erkrankung tritt auf, wenn die normale Intestinalflora durch eine Behandlung mit einem Breitspektrumantibiotikum unterdrückt wird, wodurch das opportunistische Wachstum toxinogener Stämme von *Clostridium difficile* ermöglicht wird. Die von *Clostridium difficile* gebildeten Toxine namens Toxin A und B haben eine starke enterotoxische bzw. zytotoxische Wirkung. Der Schweregrad der Krankheit kann von unkomplizierter Diarrhö bis zu einem Zustand reichen, der unter der Bezeichnung pseudomembranöse Colitis (PMC) bekannt ist und von Übelkeit, Bauchschmerzen, wässrigem Durchfall, Dehydrierung, niedrigem Fieber und dem Auftreten flacherhabener gelber Plaque auf der kolorektalen Schleimhaut gekennzeichnet ist. Eine fulminante Kolitis kann tödlich sein, wenn sie nicht behandelt wird. Es kann zu nosokomialen Ausbrüchen einer durch *Clostridium difficile* verursachten gastrointestinalen Erkrankung und Rückfällen kommen¹¹. Eine antibiotische Behandlung gegen *Clostridium difficile* kann bei der Behandlung der Krankheit erfolgreich sein.

Die Diagnose erfolgt gewöhnlich durch den Nachweis eines oder beider *Clostridium difficile*-Toxine^{3,12}. Ein auf Zellkulturen basierender Zytotoxin-Assay gilt als Referenzmethode, ist aber relativ zeitaufwendig. Immunoassays zum Nachweis von entweder nur Toxin A oder Toxin A und B zusammen sind im Rahmen der Diagnose von *Clostridium difficile*-Erkrankungen etablierte Verfahren^{4,5}. Die Existenz von nicht toxisgenen Varianten von *Clostridium difficile* unterstützt die Verwendung von Assays auf Toxinbasis zur definitiven Diagnose. Assays auf Basis von Nukleinsäuresonden wurden experimentell verwendet, können aber durch die Tatsache kompliziert werden, dass der Organismus bei rund 50 % aller Säuglinge, 20-30 % aller hospitalisierten Patienten und bei 2-3 % aller gesunden Erwachsenen in asymptomatischer Form vorkommen kann^{6,7}. Die klinische Bedeutung des Nachweises von sowohl Toxin A als auch B ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Während die meisten pathogenen Stämme beide Toxine produzieren, die synergistisch agieren können, lassen dokumentierte, ausschließlich durch Toxin B-Stämme von *Clostridium difficile* verursachte Krankheitsfälle vermuten, dass es klinisch von Bedeutung ist, sowohl auf Toxin A als auch B zu testen^{8,9,10}.

3. TESTPRINZIP

Beim ProSpecT *Clostridium difficile* Toxin A/B-Mikrotiterplatten-Assay handelt es sich um einen Immunoassay fester Phase für den Nachweis von Toxin A und Toxin B in klinischen Stuhlproben mittels spezifischer Antikörper. Eine Stuhlprobe kann mit Probenverdünnung verdünnt werden oder direkt getestet werden, wenn sie mit modifiziertem Cary Blair-Medium vorverdünnt wurde. Die Proben werden in die abbrechbaren Mikrotiterplatten-Vertiefungen gegeben, an die monoklonale Anti-Toxin- A- (Maus) und Anti-Toxin-B-Antikörper (Kaninchen) gebunden sind. Wenn Toxine vorhanden sind, werden sie vom gebundenen Antikörper „eingefangen“. Die Vertiefungen werden inkubiert und anschließend gewaschen, um das ungebundene Material zu entfernen. Das Enzymkonjugat - Anti-Toxin A (Ziege) und Anti-Toxin B (Kaninchen), markiert mit Meerrettich-Peroxidase-Enzym - wird hinzugegeben. Die Vertiefungen werden inkubiert und anschließend gewaschen, um ungebundenes Enzymkonjugat zu entfernen. Bei einer positiven Reaktion bindet das gebundene Toxin das Enzymkonjugat an die Vertiefung. Das Substrat für das Enzym, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), wird hinzugegeben. Bei einer positiven Reaktion wandelt das an die Vertiefung gebundene Enzym das Substrat in ein farbiges Reaktionsprodukt um. Die Farbentwicklung kann visuell oder mit einem Spektrophotometer ausgewertet werden. Bei einer negativen Reaktion ist kein oder nicht genügend Toxin vorhanden, um das Enzymkonjugat zu binden, und es wird kein farbiges Reaktionsprodukt gebildet.

4. SYMBOLDEFINITIONENKITTETS

 REF	Katalognummer
 IVD	In-vitro-Diagnostikum
 i	In der Packungsbeilage (IFU) nachlesen
	Temperatureinschränkungen (Lagertemperatur)
 Σ N	Ausreichend für "n" Ansätze
 LOT	Chargencode (Lotnummer)
	Verwendbar bis“ (Verfallsdatum)
	Hergestellt von
 (DILUTED SAMPLE)	Verdünnte Probe

5. INHALT DES KITS, VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

Der ProSpecT *C. difficile* Toxin A/B-Mikrotiterplatten-Assay enthält genügend Reagenzien für die Durchführung von 96 Tests.

Siehe auch die **Vorsichtsmaßnahmen** in Abschnitt 6.

Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Verpackungsetikett vermerkt.

Alle Komponenten bei 2 - 8 °C lagern.

Vor dem Gebrauch alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen und vorsichtig mischen. Unverbrauchte Reagenzien im Kühlschrank aufbewahren.

Mit Ausnahme des Waschpuffers werden die Reagenzien in der erforderlichen Konzentration geliefert. Die Reagenzien können direkt von den Tropfflaschen getropft oder zwecks Verwendung mit einer Mehrkanalpipette pipettiert werden. Zuviel ausgeschüttetes Reagenz muss entsorgt werden. Zuviel ausgeschüttetes Reagenz nicht wieder in die Flasche füllen.



Gebrauchsanweisung

Vollpipetten

Teststreifenhalterung und Abdeckung

Kurzanleitung

Mikrotiterplatte* (8 Vertiefungen/Streifen) 12 Streifen, die mit Anti-Toxin A (Maus) und Anti-Toxin B (Kaninchen) beschichtet sind. Unverbrauchte Teststreifen im Beutel mit Trockenmittel lagern, um sie vor Feuchtigkeit zu schützen.

Enzymkonjugat*

Eine Tropfflasche mit 25 ml meerrettichperoxidase- markiertem Anti-Toxin A (Ziege) und Anti-Toxin B (Kaninchen) und antimikrobiellen Mitteln

Positivkontrolle

Eine Tropfflasche mit 4 ml überstehender *C. difficile*-Toxin-A- und Toxin-B Kulturflüssigkeit und antimikrobiellen Mitteln

Negativkontrolle

Eine Troppflasche mit 4 ml gepufferter Lösung mit rotem Farbstoff und 0,1 % Natriumazid

Probenverdünnung

Eine Flasche mit 120 ml gepufferter Lösung mit rotem Farbstoff und 0,1 % Natriumazid

Waschpuffer

Eine Flasche mit 120 ml einer (10fach) konzentrierten Pufferlösung mit antimikrobiellen Mitteln.

Das 10fach-Waschpufferkonzentrat durch die Zugabe von 1 Teil Konzentrat auf 9 Teile destilliertes oder deionisiertes Wasser auf einfache Stärke verdünnen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Lagerung bei 2 - 8 °C einen Monat lang stabil.

Farbsubstrat

Eine Tropfflasche mit 25 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Puffer. Das Farbsubstrat sollte in der lichtgeschützten Flasche, in der es geliefert wird, aufbewahrt und daraus ausgegeben werden. Wenn aus einem beliebigen Grund ein Aliquot aus der Flasche entnommen wird, das unbenutzte Farbsubstrat nicht wieder in die ursprüngliche Flasche füllen.

Stopplösung

Eine Troppflasche mit 12 ml Schwefelsäure (0,46 mol/l)

***Hinweis:** Die Reagenzien von Kits verschiedener Chargennummern dürfen nicht vertauscht werden.

6. VORSICHTSMASSNAHMEN

Reagenzien nur für den in-vitro-diagnostischen Gebrauch.

Nur für die professionelle Verwendung.

Informationen zu potenziell gefährlichen Komponenten dem Sicherheitsdatenblatt oder der Produktkennzeichnung entnehmen.

GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSINFORMATIONEN

6.1. Die Reagenzien werden aus Biomaterial hergestellt und müssen als potenziell infektiös gehandhabt werden. Die Entsorgung muss unter Einhaltung entsprechender Verfahren für infektiöses Material („Biohazard“) durchgeführt werden.

6.2. Nicht mit dem Mund pipettieren. Bei der Handhabung von Proben und der Durchführung des Tests Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen. Danach die Hände gründlich waschen.

6.3. Die Proben können potenziell infektiöse Mittel enthalten und müssen unter Einhaltung der Sicherheitsstufe 2 („Biosafety Level 2“) entsprechend des CDC/NIH-Handbuchs „Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories“, 5. Ausgabe, gehandhabt werden.

6.4. Der Waschpuffer enthält Hautreizstoffe (< 0.1 % v/v). Hautkontakt vermeiden. Einweg-Schutzhandschuhe aus Vinyl oder Nitril tragen.

6.5. Den benutzten Waschpuffer in entsprechenden Behältern für infektiöses Material („Biohazard“) entsorgen.

6.6. Die Probenverdünnung und die Negativkontrolle des Kits enthalten 0,1 % Natriumazid. Azide können in einigen Rohrleitungssystemen mit Kupfer und Blei zu explosiven Salzen reagieren. Die in diesem Kit enthaltenen Mengen sind zwar gering, bei der Entsorgung azidhaltiger Materialien muss jedoch mit viel Wasser nachgespült werden.

ANALYTISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

6.7. Alle in dieser Gebrauchsanweisung enthaltenen Anweisungen sorgfältig durchlesen und befolgen.

6.8. Mit Ausnahme des Waschpufferkonzentrats werden alle Reagenzien in Arbeitskonzentration geliefert. Reagenzien nur verdünnen, wenn ausdrücklich angewiesen.

6.9. Nicht nach dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum verwenden. Die Verwendung von Reagenzien nach dem Verfallsdatum kann die Genauigkeit der Ergebnisse beeinträchtigen.

6.10. Die folgenden allgemeinen Reagenzien können in der ProSpecSerie produktübergreifend verwendet werden: Waschpuffer, Farbsubstrat und Stopplösung.

6.11. Durch eine mikrobielle Kontaminierung der Reagenzien kann die Testgenauigkeit vermindert werden. Beim Entnehmen von aliquoten Teilen aus den Reagenzflaschen sterile Einwegpipetten verwenden, um eine mikrobielle Kontaminierung der Reagenzien zu vermeiden.

6.12. Vor der Verwendung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20 -25 °C) bringen.

6.13. Teststreifen im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel lagern, um die Vertiefungen vor Feuchtigkeit zu schützen.

6.14. Die Stuhlproben müssen vor der Verarbeitung der Probe gründlich gemischt werden, um eine genaue Darstellung der Probe sicherzustellen. DIE PROBEN VOR DEM TEST NICHT KONZENTRIEREN.

6.15. Das Farbsubstrat ist lichtempfindlich. Wenn das Reagenz Licht ausgesetzt wird und Farbe entwickelt, muss es entsorgt werden.

6.16. Bediener, die an Farbenblindheit oder anderen Sehschwächen leiden, können das Testergebnis nicht visuell ablesen und müssen die Messergebnisse mithilfe des Spektrophotometers auswerten.

6.17. Reagenzien während des gesamten Verfahrens in der gleichen Reihenfolge in die Vertiefungen pipettieren. Die Flüssigkeit in den Vertiefungen nicht mit den Tropföffnungen berühren, um Kontaminierung zu vermeiden.

6.18. Die Inkubationszeit genau einhalten. Nach dem Hinzufügen des Reagens in die letzte Vertiefung auf jeder zu testenden Mikrotiterplatte die Zeitmessung starten. Nie mehr als drei Platten mit jeweils 96 Vertiefungen gleichzeitig bearbeiten, um die genaue Zeitmessung sicherzustellen. Abweichungen von diesem Testverfahren können die Testergebnisse beeinträchtigen.

6.19. Es ist wichtig, dass die Tropfflasche senkrecht gehalten wird und der Tropfen sich an der Spitze bildet. Falls die Spitze nass wird, bildet sich ein Tropfen mit dem falschen Volumen um das Ende herum und nicht an der Spitze. In diesem Fall die Spitze vor dem Fortfahren trocknen.

7. GEWINNUNG VON STUHLPROBEN

Die Standardverfahren zur Entnahme und Handhabung von Stuhlproben des jeweiligen Labors können eingesetzt werden.

FRISCH Unbehandelte Proben können bei 2 - 8 °C gelagert und müssen innerhalb von 48 Stunden getestet werden. Frische Proben, die mit der im Kit enthaltenen Probenverdünnung verdünnt wurden, können bis zum Test bei Raumtemperatur bis zu 8 Stunden und gekühlt bis zu 72 Stunden gelagert werden.

GEFROREN Wenn die frischen Stuhlproben nicht innerhalb von 48 Stunden getestet werden können, diese bei -20 °C oder kälter einfrieren und innerhalb von 2 Monaten testen. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden, da dies zum Abbau der Toxine führen kann.

CARY BLAIR Proben, die in modifiziertem Cary Blair-Transportmedium mit Indikator (oder vergleichbar) konserviert wurden, können bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) maximal 5 Tage bis zum Test aufbewahrt werden. Stuhlproben, die konzentriert oder in 10 % Formalin, SAFoder PVA-Fixiermittel behandelt wurden, sind nicht geeignet.

8. TESTVERFAHREN

IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

Siehe **Inhalt** in Abschnitt 5

ERFORDERLICHES, JEDOCH NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENES MATERIAL

Behälter für die Entnahme von Stuhlproben
Einwegröhrchen aus Kunststoff oder Glas
Stoppuhr zum Messen von Minuten
Waschflasche für Waschpuffer
Destilliertes oder deionisiertes Wasser

OPTIONALE MATERIALIEN (NICHT MITGELIEFERT)

Lesegerät für Mikrotiterplatten, das 450/620 bis 650 nm messen kann
Abstrichtupfer mit Baumwoll- oder Rayonspitze
Mikropipette für Volumen bis 200 µl
Vortexmischer mit Plattenadapter oder Plattenschüttler
Modifiziertes Cary Blair-Transportmedium

TESTVERFAHREN

8.1. Probenvorbereitung: Zur Vorbereitung der Proben eine der im Folgenden beschriebenen drei Vorbereitungsmethoden verwenden.

A	Geformte Stuhlproben
1.	Jeweils ein Röhrchen pro Stuhlprobe beschriften.
2.	0,8 ml Probenverdünnung in jedes Röhrchen geben.
3.	Mit einem Holz-Applikatorstäbchen 0,2 g (Erbsengröße) Probe hinzugeben.
4.	Probe in der Probenverdünnung gut verrühren.
5.	Eine Vollpipette in das Röhrchen halten und den Inhalt des Röhrchens durch einmaliges Einziehen und Ausgeben vermischen.
6.	Vollpipette in Röhrchen belassen.
7.	WEITER MIT SCHRITT 8.2

B	Flüssige und halb feste Stuhlproben
1.	Jeweils ein Röhrchen pro Stuhlprobe beschriften.
2.	0,8 ml Probenverdünnung in jedes Röhrchen geben.
3.	Die Proben durch Schütteln der Probenbehälter mischen.
4.	Mithilfe von Vollpipetten 0,2 ml (zweite Markierung von der Spitze der Pipette) aufziehen.
5.	Probe in Probenverdünnung geben.
6.	Durch einmaliges Hoch- und Herunterziehen mischen.
7.	Vollpipette in Röhrchen belassen.
8.	WEITER MIT SCHRITT 8.2

C	Cary Blair-Stuhlproben
1.	Das Transportröhrchen mehrmals umdrehen, um die Probe gründlich zu mischen.
2.	Es ist keine weitere Verdünnung der Probe erforderlich.
3.	WEITER MIT SCHRITT 8.2

8.2. Den Beutel öffnen, die erforderliche Anzahl von Teststreifen entnehmen und in einen Teststreifenhalter geben. Eine Vertiefung für die Negativkontrolle und eine weitere für die Positivkontrolle verwenden. Wenn weniger als 8 Vertiefungen benötigt werden, die erforderliche Anzahl von Vertiefungen abbrechen und die nicht benötigten Vertiefungen wieder in den Beutel mit Trockenmittel geben. DEN BEUTEL WIEDER FEST VERSCHLIESSEN, UM DEN INHALT VOR FEUCHTIGKEIT ZU SCHÜTZEN UND IM KÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN.

8.3. 4 Tropfen (200 µl) Negativkontrolle in Vertiefung A1 geben. **4 Tropfen** (200 µl) Positivkontrolle in Vertiefung B1 geben.

8.4. Mithilfe von Vollpipetten 0.2 ml (zweite Markierung von der Spitze der Pipette) jeder Stuhlprobe in eine Vertiefung

geben. **Hinweis:** Die Öffnung der Vollpipetten etwas in die Vertiefungen halten, um Spritzer in die angrenzenden Vertiefungen zu vermeiden.

8.5. Die Mikrotiterplatte **abdecken** und bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) **60 Minuten** lang inkubieren. Mit der Zeitmessung nach dem Hinzufügen der letzten Stuhlprobe beginnen.

8.6. Den Inhalt durch Schütteln oder Absaugen aus den Vertiefungen entfernen. Alle Vertiefungen waschen, indem diese vollständig mit **verdünntem** Waschpuffer (~350 - 400 µl pro Vertiefung) gefüllt werden. Nach jedem Waschen alle Flüssigkeiten aus den Vertiefungen ausschütten oder aspirieren. Insgesamt **3 Mal** waschen. Den Inhalt der Platte nach dem letzten Waschvorgang durch Ausklopfen auf sauberem Papier oder Absaugen entfernen. So viel Waschpuffer wie möglich entfernen. Die Vertiefungen dürfen jedoch niemals vollkommen trocken sein.

8.7. Jeweils **4 Tropfen** (200 µl) Enzymkonjugat in die Vertiefungen geben.

8.8. Die Mikrotiterplatte **abdecken** und bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) **30 Minuten** lang inkubieren.

8.9. Vertiefungen **5 Mal** ausschütteln oder absaugen und waschen (siehe Schritt 8.6).

8.10. Jeweils **4 Tropfen** (200 µl) Farbsubstrat in die Vertiefungen geben.

8.11. Die Mikrotiterplatte **abdecken** und bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) **10 Minuten** lang inkubieren.

8.12. Jeweils **1 Tropfen** (50 µl) Stopplösung in die Vertiefungen geben. Vorsichtig auf die Vertiefungen klopfen oder diese in einem Vortexmischer mischen, bis ein gleichmäßig gelber Farbton entsteht. Die Reaktionen innerhalb von **10 Minuten** nach dem Hinzufügen der Stopplösung ablesen. Die Reaktion visuell oder spektrophotometrisch bei 450/620 bis 650 nm (zwei Wellenlängen) ablesen.

9. QUALITÄTSKONTROLLE

Positiv- und Negativkontrollen müssen bei jeder Testdurchführung hinzugegeben werden. Sie dienen sowohl als Reagenzien als auch als Verfahrenskontrollen. Die Kontrollen sollen die Reagenzien auf erhebliche Fehler hin überwachen. Die Positivkontrolle ist nicht in der Lage, die Präzision am Cut-off-Wert zu gewährleisten.

Die optische Dichte der Negativkontrolle muss bei 450/620 bis 650 nm < 0,080 betragen und die Negativkontrolle muss beim visuellen Ablesen farblos (Intensität < 1+) sein. Wenn in der Negativkontrolle eine gelbe Färbung vorliegt, die 1+ oder höher auf der Kurzanleitung entspricht, muss der Test unter genauer Einhaltung des Waschverfahrens wiederholt werden.

Die optische Dichte der Positivkontrolle muss bei 450/620 bis 650 nm ≥ 0,500 betragen und die Positivkontrolle muss beim visuellen Ablesen eine Reaktion von mindestens 2+ aufweisen. Wenn die gelbe Färbung in der Positivkontrolle geringer als 2+ der Kurzanleitung ist, technische Unterstützung hinzuziehen.

10. ERGEBNISSE

Für die Farbauswertung die beiliegende Kurzanleitung einsehen. VISUELL

10.1. 10.1 Die Testergebnisse durch Vergleichen mit den Reaktionsfarben der Kurzanleitung ablesen.

Positiv: gelbe Färbung mit einer Intensität von mindestens 1+

Negativ: farblos

10.2. Auswertung der visuellen Ergebnisse:

Positiv: Wenn sich in der Testvertiefung eine gelbe Färbung mit einer Intensität von mindestens 1+ entwickelt, enthält die Probe Toxin A oder B oder beide und der Test ist positiv.

Hinweis: Tests mit blassgelber Färbung (weniger als 1+) müssen wiederholt werden.

Negativ: Eine farblose Reaktion ist ein negatives Ergebnis und bedeutet, dass kein oder eine nicht messbare Konzentration an Toxin A oder B in der getesteten Probe vorhanden ist.

Spektrophotometrisch

10.3. Die Ergebnisse bei zwei Wellenlängen (450/620 bis 650 nm) ablesen.

10.4. Die optische Dichte der Negativkontrolle ablesen. Die optische Dichte muss bei 450/620 bis 650 nm < 0,080 betragen. Wenn die optische Dichte 0,080 übersteigt, sind die Ergebnisse ungültig und der Test muss unter genauer Einhaltung der Waschanweisungen wiederholt werden.

10.5. Die optische Dichte der Positivkontrolle muss bei 450/620 bis 650 nm ≥ 0,500 betragen.

10.6. Ablesen der Testergebnisse:

Positiv: Optische Dichte ≥ 0,080

Negativ: Optische Dichte < 0,080

10.7. Auswertung der spektrophotometrischen Ergebnisse:

Positiv: Positiv für *C. difficile*-Toxin A und/oder B. Ein positiver Test bedeutet nicht zwangsläufig, dass die Erkrankung vorliegt. Die Ergebnisse müssen in Verbindung mit anderen klinischen Befunden bewertet werden, um eine Diagnose zu stellen.

Negativ: Negativ für *C. difficile*-Toxin A und/oder B. Eine Infektion kann nicht ausgeschlossen werden, da das in der Probe vorhandene Toxin in Konzentrationen vorliegen kann, die unter der Nachweisgrenze des Tests liegen.

***Hinweis:** Alle Vertiefungen, die visuell klar aussehen, aber eine optische Dichte ergeben, die mit der visuellen Auswertung nicht übereinstimmt, sind als abweichende Werte zu betrachten. Die Vertiefung sollte auf Blasen, kleine Par tikel oder einen undurchsichtigen Film auf dem Boden der Vertiefung untersucht werden. Zum Entfernen des Films die Unterseite der Vertiefungen abwischen und die optische Dichte erneut ablesen. Wenn die Diskrepanz zwischen visuellen und spektrophotometrischen Werten fortbesteht, den Test wiederholen.

GRENZEN DER METHODE

Die Gültigkeit der Ergebnisse, die mit dem ProSpecT *Clostridium difficile*-Toxin-A/B-Mikrotiterplatten-Assay erhalten werden, hängt vom Verlauf der Kontrollreaktionen ab. Siehe **Qualitätskontrolle** in Abschnitt 9.

Ein positiver Test bedeutet nicht zwangsläufig, dass die Erkrankung vorliegt. Der Test weist die Gegenwart von Toxin A und/oder B in Stuhlproben nach. Die Ergebnisse müssen in Verbindung mit anderen klinischen Befunden bewertet werden, um eine Diagnose zu stellen.

Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit des Vorhandenseins von *C. difficile*-Toxin A oder Toxin B nicht aus und kann auftreten, wenn die Toxinkonzentration in der Probe unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Toxinkonzentration und dem Vorliegen bzw. der Schwere der Erkrankung hergestellt werden.

Wie bei allen diagnostischen In-vitro-Tests sind die Ergebnisse zusammen mit den klinischen Befunden und/oder anderen Labortests zu interpretieren.

Die korrekte Gewinnung und Verarbeitung der Stuhlproben sind für die optimale Testdurchführung von größter Bedeutung. Optimale Testergebnisse werden von Proben erhalten, die innerhalb von 48 Stunden nach der Entnahme gestestet werden. Siehe **Gewinnung von Stuhlproben** in Abschnitt 7.

Die Leistungsdaten dieses Tests wurden nicht anhand von pädiatrischen Populationen bewertet.

11. ERWARTETE WERTE

Ein *C. difficile*-Kolitis tritt wesentlich häufiger bei hospitalisierten Patienten auf und ist die vierthäufigste nosokomiale Krankheit, die den US-amerikanischen Gesundheitsämtern (Centres for Disease Control and Prevention) gemeldet wird. *C. difficile* ist für 20 bis 30 % aller antibiotika-assoziierten Diarrhöen und für über 90 % aller Fälle von pseudomembranöser Kolitis verantwortlich. Die Inzidenz der nosokomialen CDAD kann für verschiedene Krankenhauspopulationen variieren und wird vom Vorhandensein prädisponierender Faktoren beeinflusst, so z. B. einem höheren Alter des Patienten, der Art und Dauer der antimikrobiellen Behandlung, der Schwere der zugrunde liegenden Erkrankung(en) und der Dauer des Krankenhausaufenthaltes. *C. difficile* ist bei 3 bis 5 % aller gesunden Erwachsenen und bei bis zu 50 % aller Säuglinge vorhanden; Jugendliche sind asymptomatische Träger sowohl der Bakterien als auch ihrer Toxine¹³.

12. LEISTUNGSDATEN

VERGLEICH ZUM GEWEBEKULTUR-ZYTOTOXIZITÄTSASSAY

Die Tests wurden in drei klinischen Laboren in Nordamerika ausgeführt. Für alle ausgewerteten Proben betrug die Gesamtsensitivität des ProSpecT *Clostridium difficile*-Toxin-A/B-Mikrotiterplatten-Assays im Vergleich zum Gewebekultur-Zytotoxizitäts-Assay (CTA) 90,3 % (149/165), und die Gesamtspezifität lag im Vergleich zum CTA bei 96,2 % (576/599).

		CTA-Ergebnisse		
GESAMT		+	-	
ProSpecT EIA-Ergebnisse		+	149	23
		-	16	576
Gesamt			165	599

90,3 % Sensitivität (149/165); 95 % KI = 84,7 % - 94,4 %
96,2 % Spezifität (576/599); 95 % KI = 94,3 % - 97,5 %

VISUELLE AUSWERTUNG DES TESTS

Visuell abgelesene Daten wurden in zwei von den drei Laboren für insgesamt 586 Proben gesammelt. Die Sensitivität betrug im Vergleich zu CTA insgesamt 85,0 % und die Spezifität insgesamt 95,5 %. Die Übereinstimmung der visuell abgelesenen Ergebnisse mit den spektrophotometrischen Ergebnissen betrug 99,0 % (580/586).

		CTA-resultater		
		+	-	
ProSpecT EIA visuelle resultater		+	85	22
		-	15	464
Gesamt			100	486

85,0% sensitivitet (85/100), 95% CI = 76,5% - 91,4%
95,5% specificitet (464/486), 95% CI = 93,2% - 97,1%

LEISTUNG IM VERGLEICH ZUM PRÄDIKATIVEN TEST

Der ProSpecT *Clostridium difficile*-Toxin- A/B-Mikrotiterplatten-Assay wurde mit zwei handelsüblichen Enzymimmunoassays (prädikativen Tests) verglichen. Die Leistung des ProSpecT *Clostridium difficile*-Toxin- A/B-Mikrotiterplatten-Assays und der prädikativen Tests sah im Vergleich zu einem CTA (unter Verwendung derselben Proben) wie folgt aus:

EIA	Leistung im Vergleich zu CTA			
	Sensitivität		Spezifität	
	#	%	#	%
ProSpecT	33/40	82.5	263/268	98.1
Präd. Test 1	33/40	82.5	260/268	97.0

ProSpecT	115/124	92.7	302/320	94.4
Präd. Test 2	98/124	79.0	309/320	96.6

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Der ProSpecT *Clostridium difficile*-Toxin-A/B-Mikrotiterplatten-Assay ermöglicht den Nachweis von Toxin A bei Konzentrationen ≥ 0,20 ng/ml und von Toxin B bei Konzentrationen ≥ 0,61 ng/ml.

REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit wurde an drei verschiedenen Zentren an drei verschiedenen Tagen anhand von vier Blindproben ermittelt. Jedes Zentrum testete acht gleiche Vertiefungen jeder Probe an jedem Testtag (n=288). Die Proben umfassten eine negative Probe und drei positive Proben mit verschiedenen Reaktionsstärken. Der mittlere Inter-Assay-Variationskoeffizient (VK, Lauf zu Lauf) lag für eine Probe des mittleren

Bereichs bei 18,9 %. Der mittlere Intra-Assay-Variationskoeffizient (innerhalb eines Laufs) lag für eine Probe des mittleren Bereichs bei 7,7 %.

KREUZREAKTIVITÄT

Es wurden vierzig Mikroorganismen mit dem ProSpecT *Clostridium difficile*-Toxin-A/B-Mikrotiterplatten-Assay bewertet. Die Bakterien- und Hefeisolate wurden bei ≥ 10⁸ KbE/ml getestet. Die Virusisolate wurden in Konzentrationen von 10⁴ TCID₅₀/ml (Infektionsdosis pro ml Gewebekultur) gestestet. Es wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet.

Der getestete Stamm von Clostridium sordellii (ATCC® 9714) wies keine Kreuzreaktivität auf. In der Fachliteratur wird jedoch darauf hingewiesen, dass gewisse Stämme von C. sordellii Toxine bilden können, die eine Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen *C. difficile*-Toxin A und B zeigen.

Folgende Organismen wurden mit dem ProSpecT *Clostridium difficile*-Toxin-A/B-Mikrotiterplatten-Assay getestet.

<i>Adenovirus</i> Type 40	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Adenovirus</i> Type 41	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Aeromonas hydrophilla</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Parphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Candida albicans</i>	Rotavirus
<i>Clostridium beijerinckii</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Clostridium difficile</i> (non-toxicenic)	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Clostridium haemolyticum</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Clostridium novyi</i> (toxin A)	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Clostridium perfringens</i> (type A)	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan)
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Vibrio cholerae</i>

<i>Clostridium tetani</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

13. STÖRSUBSTANZEN

Die folgenden Substanzen wurden mit dem ProSpecT *Clostridium difficile*-Toxin-A/B-Mikrotiterplatten-Assay getestet: Vancomycin (12,5 mg/ml), Metronidazol (12,5 mg/ml), Blut, Schleim, Fäkalfett und die folgenden nicht rezeptpflichtigen Antidiarrhoika: Pepto-Bismol®, Imodium® A-D, Kaopectate® (Wirkstoffe: Bismutum subsalicylicum, Loperamid HCl und Attapulgit). Es wurde keine Interferenz mit positiven oder negativen Proben beobachtet.

14. LITERATURVERWEISE

- Bartlett, J.G., 2002.**

N. Engl. J. Med. 346(5): 334-339.
- Kelly, C.P. and J.T. LaMont, 1988.**

Ann. Rev. Med. 49: 375-390.
- Wilkins, T. and D.M. Lyerly, 2003.**

J. Clin. Microbiol. 41: 531-534.
- O’Connor, D., P. Hynes, M. Cormican, E. Collins, G. Corbette-Feeney and M. Cassidy, 2001.**

J. Clin. Microbiol. 39: 2846-2849.
- Turgeon, D.K., T.J. Novicki, J. Quick, L. Carlson, P. Miller, B. Ulness, A. Cent, R. Ashley, A. Larson, M. Coyle, A.P. Limaye, B.T. Cookson and T.R. Fritsche, 2003.**

J. Clin. Microbiol. 41: 667-670.
- Gumerlock, P.H., Y.J. Tang, J.B. Weiss and J. Silva Jr., 1993.**

J. Clin. Microbiol. 31: 507-511.
- Belanger, S.D., M. Boissinot, N. Clairoux, F.J. Picard and M.G. Bergeron, 2003.**

J. Clin. Microbiol. 41: 730-734.
- Limaye, A.P., D.K. Turgeon, B.T. Cookson and T.R. Fritsche, 2000.**

J. Clin. Microbiol. 38: 1696-1697.
- Alfa, M.J., A. Kabani, D. Lyerly, S. Moncrief, L.M. Neville, A. Al-Barrak, G.K.H. Harding, B. Dyck, K. Olekson and J.M. Embil, 2000.**

J. Clin. Microbiol. 38: 2706-2714.
- Barbut, F., V. Lalande, B. Burghoffer, H.V. Thien, E. Grimprel and J. Petit, 2002.**

J. Clin. Microbiol. 40: 2079-2083.
- Lyerly, D.M., L.M. Neville, D.T. Evans, J. Fill, S. Allen, W. Greene, R. Sautter, P. Hnatuck, D.J. Torpey, and R. Schwalbe. 1998.**

J. Clin. Microbiol. 36:184-190.
- Nicholson, G., and M. Jones. 1999.**

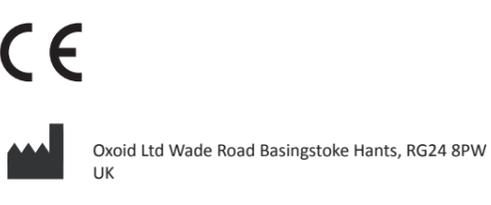
Br. J. Biomed. Sci. 56:204-208.
- Mandell, G.L., J.E. Bennett, and R. Dolin. 2000.**

Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practices of Infectious Diseases. 5th ed. Churchill Livingstone. New York, NY.

ProSpecT™ ist eine eingetragene Marke.

ATCC® ist eine eingetragene Marke von American Type Culture Collection.

Pepto-Bismol®, Imodium® und Kaopectate® sind eingetragene Marken von Procter & Gamble, McNeil Consumer & Specialty Pharmaceuticals und Pharmacia & Upjohn Company.



Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an Ihren Händler.

IFU X7593A, überarbeitet am Juni 2015