

Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B *Package Insert*

A rapid test for the detection of *C. difficile* toxins A and B in fecal specimens
Catalog No. 23900550 (25 Tests)
Patent Pending

INTENDED USE

The Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B test is a rapid immunoassay for detecting *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens from persons suspected of having *C. difficile* disease. The test is to be used as an aid in the diagnosis of *C. difficile* disease and results should be considered in conjunction with the patient history. For *in vitro* diagnostic use.

EXPLANATION

After treatment with antibiotics, many patients develop gastrointestinal problems ranging from mild diarrhea to severe pseudomembranous colitis. Many cases of the milder forms of gastrointestinal illness and most cases of pseudomembranous colitis are caused by toxigenic strains of *Clostridium difficile* (1). This organism is an opportunistic anaerobic bacterium that grows in the intestine once the normal flora has been altered by the antibiotic. Toxigenic strains of *C. difficile* carry the genes encoding the toxins while non-toxigenic strains do not carry the toxin genes. The disease results from the toxins that the toxigenic organism produces. The clinical symptoms associated with the disease are believed to be primarily due to toxin A, which is a tissue-damaging enterotoxin (2,3). *C. difficile* also produces a second toxin, designated toxin B. Toxin B, which has been referred to as the cytotoxin of the organism, is the toxin detected by the tissue culture assay currently used by many laboratories. Toxigenic *C. difficile* strains produce both toxins or only toxin B (4-7).

PRINCIPLE OF THE TEST

The Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B uses antibodies specific for toxins A and B of *C. difficile*. The device contains a *Reaction Window* with two vertical lines of immobilized antibodies (Fig. 1a). The test line ("T") contains antibodies against *C. difficile* toxins A and B. The control line ("C") contains anti-IgG antibodies. The *Conjugate* consists of antibodies to toxins A and B coupled to horseradish peroxidase. To perform the test, the sample is added to a tube containing a mixture of *Diluent* and *Conjugate*. The diluted sample-conjugate mixture is added to the *Sample Well* and the device is allowed to incubate at room temperature for 15 minutes. During the incubation, any toxin A and toxin B in the sample bind to anti-toxin antibody-peroxidase conjugate. The toxin-antibody complexes migrate through a filter pad to a membrane where they are captured by the immobilized anti-toxin antibodies in the line. The *Reaction Window* is subsequently washed with *Wash Buffer*, and the test is developed with the addition of *Substrate*. After a 10 minute incubation period, the "T" reaction is examined visually for the appearance of a vertical blue line on the "T" side of the *Reaction Window*. A blue line indicates a positive test. A positive "C" reaction, indicated by a vertical blue line on the "C" side of the *Reaction Window*, confirms that the test is working properly and the results are valid.

MATERIALS PROVIDED

Membrane Devices – 25 pouches, each containing 1 device and a desiccant pack

Diluent (14mL) – Buffered protein solution containing 0.02% thimerosal with graduated dropper assembly

Wash Buffer (10mL) – A buffered solution containing 0.02% thimerosal with graduated dropper assembly

Substrate (3.5mL) – Solution containing tetramethylbenzidine

Conjugate (2mL) – Mouse monoclonal antibody specific for toxin A coupled to horseradish peroxidase and goat polyclonal antibody specific for toxin B coupled to horseradish peroxidase in a buffered protein solution containing 0.02% thimerosal

Positive Control (1mL) – Antigen in a buffered protein solution

Disposable plastic transfer pipettes – 50 (graduated at 25 μ L and 400 μ L)

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Small test tubes (e.g., plastic Eppendorf tubes)

Applicator sticks

Timer

Vortex mixer

Disposable gloves for handling fecal samples

Pipettor and tips

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date of the kit is given on the label. Expiration dates for each component are listed on the individual labels. The kit should be stored between 2° and 8°C.

PRECAUTIONS

1. Reagents from different kits should not be mixed. Do not use a kit past the expiration date.
2. Bring all components to ROOM TEMPERATURE BEFORE USE!
3. Caps, tips and dropper assemblies are color-coded; do NOT mix or interchange!
4. Do not freeze the reagents. The kit should be stored between 2°C and 8°C.
5. The pouch containing the *Membrane Device* should be at room temperature before opening, and opened just before use. Keep the membrane devices dry before use.
6. Use fecal specimens within 72 hours of collection to obtain optimal results. Specimens that are frozen may lose activity due to freezing and thawing.
7. Specimens that have been preserved in 10% formalin, merthiolate formalin, sodium acetate formalin or polyvinyl alcohol cannot be used.
8. Specimens in transport media such as Cary Blair and C&S can be used as specified in the specimen preparation protocol.
9. Hold reagent bottles vertically to dispense reagents to ensure consistent drop size.
10. Specimens and membrane devices should be handled and disposed of as potential biohazards after use. Wear disposable gloves when doing the test.
11. Reagents contain thimerosal as a preservative and should be handled with normal laboratory caution.
12. Membrane devices cannot be reused.
13. The test has been optimized for sensitivity and specificity. Alterations of the specified procedure and/or test conditions may affect the sensitivity and specificity of the test. Do not deviate from the specified procedure.
14. Microbial contamination of reagents may decrease the accuracy of the assay. Avoid microbial contamination of reagents by using sterile disposable pipettes if removing aliquots from reagent bottles.
15. Be attentive to the total assay time when testing more than one fecal specimen. Add

Diluent first, then add the *Conjugate* to each tube of *Diluent*. Then add specimen to the tube of *Diluent/Conjugate*. Thoroughly mix all of the diluted specimens, and then transfer to the *Membrane Device*. The 15-minute incubation step begins after the last diluted sample-conjugate mixture has been transferred to the final *Membrane Device*.

COLLECTION AND HANDLING OF FECAL SPECIMENS

1. Standard collection and handling procedures used in-house for fecal specimens are appropriate. Specimens should be stored between 2° and 8°C; test specimens that are less than 24 hours old, whenever possible.
2. Store specimens frozen ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) if the test cannot be performed within 72 hours of collection, but note that freezing and thawing of the specimen may result in loss of activity due to degradation of the toxins.
3. Make sure that specimens are thoroughly mixed PRIOR to performing the assay.
4. Storing fecal specimens in the *Diluent* is NOT recommended.
5. Do not allow the fecal specimens to remain in the *Diluent* and/or *Conjugate* for any extended period of time.

SPECIMEN PREPARATION

1. Bring all reagents and the required number of devices to room temperature before use.
2. Set up and label one small test tube for each specimen, and optional external controls as necessary.
3. Add 500 μL *Diluent* to each tube for fecal specimens using the graduated black dropper assembly (or equivalent). For specimens in transport media such as Cary Blair or C&S, add 425 μL of *Diluent* to the tube.
4. Add one drop of *Conjugate* (red capped bottle) to each tube.
5. Obtain one disposable plastic transfer pipette (supplied with the kit) for each sample – the pipettes have raised graduations at 25 μL and 400 μL .
6. Mix all specimens thoroughly regardless of consistency- it is essential that the specimens be evenly suspended before transferring.

Liquid/Semi-solid specimens – pipette 25 μL of specimen with a transfer pipette (graduated at 25 μL and 400 μL) and dispense into the *Diluent/Conjugate* mixture. Use the same transfer pipette to mix the diluted specimen.

Formed/Solid specimens – Care must be taken to add the correct amount of formed feces to the sample mixture. Mix the specimen thoroughly using a wooden applicator stick and transfer a small portion (approximately 2mm diameter, the equivalent of 25 μL) of the specimen into the *Diluent/Conjugate* mixture. Emulsify the specimen using the applicator stick.

Fecal specimens in Cary Blair or C&S transport media - pipette 100 μL of sample into the *Diluent/Conjugate* mixture.

7. Optional External Control Samples:

External Positive Control - add one drop of *Positive Control* (gray-capped bottle) to the appropriate test tube.

External Negative Control - add 25 μL *Diluent* to the appropriate test tube.

NOTE: Transferring too little specimen, or failure to mix and completely suspend the specimen in the Diluent mixture, may result in a false-negative test result. The addition of too much fecal specimen may cause invalid results due to restricted sample flow.

TEST PROCEDURE

1. Obtain one *Membrane Device* per specimen, and one device per optional external

positive or negative control as necessary. The foil bags containing the devices should be brought to room temperature before opening. Label each device appropriately and orient it on a flat surface so the letter “C” on the device is on the left, the letter “T” is on the right, and the small *Sample Well* is located in the top right corner of the device (Fig. 1a).

2. Close each tube of diluted specimen and mix thoroughly. Proper mixing can be achieved by vortexing or inverting the tube. Immediately proceed to Step #3.
3. Using a transfer pipette (graduated at 25µL and 400µL), transfer 400µL of the diluted sample-conjugate mixture into the *Sample Well* (smaller hole in the top right corner of the device) of a *Membrane Device*, making certain to expel the liquid sample onto the wicking pad inside of the *Membrane Device*.
4. Incubate the device at room temperature for 15 minutes – the sample will wick through the device and a wet area will spread across the *Reaction Window* (larger hole in the middle of the device).

NOTE FOR SAMPLES THAT FAIL TO MIGRATE:

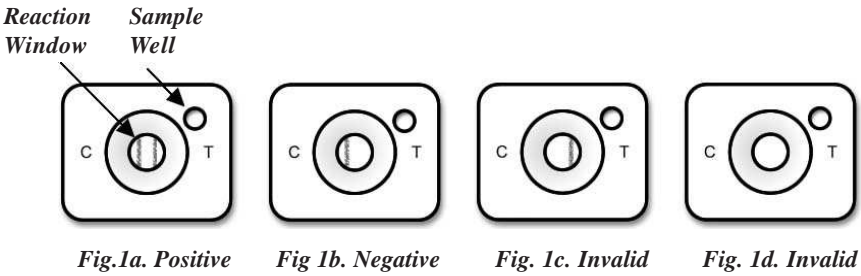
Occasionally, a diluted fecal specimen cannot be tested because it clogs the membrane and the Reaction Window does not wet properly. If the diluted fecal specimen fails to migrate properly within 5 minutes of adding the sample to the Sample Well (i.e. the membrane in the Reaction Window does not appear to be completely wet), then add 100µL (4 drops) of Diluent to the Sample Well and wait an additional 5 minutes (for a total of 20 minutes).

5. After the incubation, add 300µL of *Wash Buffer* to the *Reaction Window* using the graduated white dropper assembly (or equivalent). Allow the *Wash Buffer* to flow through the *Reaction Window* membrane and be absorbed completely.
6. Add 2 drops of *Substrate* (blue-capped bottle) to the *Reaction Window*. Read and record results visually after 10 minutes.

INTERPRETATION OF RESULTS

1. Interpretation of the test is most reliable when the device is read immediately at the end of the reaction period. Read the device at a normal working distance in a well-lit area. View with a line of vision directly over the device.
2. Observe device for the appearance of a blue line on the “C” side of the *Reaction Window* representing the internal positive control line. Observe device for the appearance of a blue line on the “T” side of the *Reaction Window* representing the test line. The lines may appear faint to dark in intensity.
3. **Positive Result:** A positive result may be interpreted at any time between the addition of *Substrate* and the 10-minute read time. Two blue lines are visible, the control line (“C”) and the test line (“T”). The lines may appear faint to dark in intensity. The appearance of a blue line on the “T” side along with a blue control line is interpreted as a positive result. An obvious partial line is interpreted as a positive result. Do not interpret membrane discoloration or shadow as a positive result. A positive result indicates the presence of *C. difficile* toxin.
4. **Negative Result:** A test cannot be interpreted as negative or invalid until 10 minutes following the addition of *Substrate*. A single blue line is visible on the control (“C”) side of the *Reaction Window* and no test line is visible on the “T” side of the *Reaction Window* (Fig. 1b). A negative result indicates *C. difficile* toxin is either absent in the specimen or is below the detection limit of the test.
5. **Invalid Result:** A single line is visible on the test (“T”) side of the *Reaction Window*, or no lines are visible in the *Reaction Window* (Fig. 1c, 1d). The test result is invalid if a control line is not present at the completion of the reaction period.

FIGURE 1: Sure-Vue® C. difficile TOX A/B INTERPRETATION OF RESULTS



QUALITY CONTROL

Internal: A blue control line must be visible on the “C” side of the *Reaction Window* on every *Membrane Device* that is tested. The appearance of the blue control line confirms that the sample and reagents were added correctly, that the reagents were active at the time of performing the assay, and that the sample migrated properly through the *Membrane Device*. A clear background in the result area is considered an internal negative control. If the test has been performed correctly and reagents are working properly, the background will be clear to give a discernible result.

External: The reactivity of the Sure-Vue® C. difficile TOX A/B test should be verified on receipt using the *Positive Control* and negative control (*Diluent*). The *Positive Control* is supplied with the kit (gray-capped bottle). The *Positive Control* confirms the reactivity of the other reagents associated with the assay, and is not intended to ensure precision at the analytical assay cut-off. *Diluent* is used for the negative control. Additional tests can be performed with the controls to meet the requirements of local, state and/or federal regulations and/or accrediting organizations.

LIMITATIONS

1. The Sure-Vue® C. difficile TOX A/B test is used to detect *C. difficile* toxin(s) in fecal specimens. The test confirms the presence of toxin in feces and this information should be taken under consideration by the physician in light of the clinical history and physical examination of the patient. The Sure-Vue® C. difficile TOX A/B test will detect levels of toxin A at $\geq 0.63\text{ng/mL}$ and toxin B at $\geq 1.25\text{ng/mL}$.
2. Fecal specimens are extremely complex. Optimal results with the Sure-Vue® C. difficile TOX A/B test are obtained with specimens that are less than 24 hours old. Most undiluted specimens can be stored between 2° and 8°C for 72 hours before significant degradation of the toxin is noted. If specimens are not assayed within this time period, they may be frozen and thawed. However, repeated freezing and thawing may result in loss in the immunoreactivity of toxins A and B.
3. Some specimens may give weak reactions. This may be due to a number of factors such as the presence of low levels of toxin, the presence of binding substances, or inactivating enzymes in the feces. *Under these conditions, a fresh specimen should be tested.* Additional tests that may be used in conjunction with the Sure-Vue® C. difficile TOX A/B test include culture with toxigenic testing or tissue culture cytotoxicity assay for the detection of *C. difficile* or its toxin(s).
4. Fecal specimens preserved in 10% formalin, merthiolate formalin, sodium acetate formalin, or polyvinyl alcohol cannot be used.

5. The Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B test is qualitative. The intensity of the color should not be interpreted quantitatively.
6. Some isolates of *C. sordellii* may react in the Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B test due to the production of immunologically related toxins (1).
7. Colonization rates of up to 50% have been reported in infants. A high rate has also been reported in cystic fibrosis patients (1,3).

EXPECTED VALUES

The reported incidence of *C. difficile*-associated disease in patients with antibiotic-associated diarrhea is 10 to 20%. In our studies, the incidence ranged from 10% to 22%. The prevalence of a positive Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B test will vary from location to location and hospitals may experience rates lower or higher than those observed at the sites used in this evaluation. *Clostridium difficile* disease is primarily a nosocomial disease of elderly patients, and hospitals that have higher numbers of elderly patients may experience higher rates. It is important to consider any test results in conjunction with clinical symptoms because some healthy adults and large numbers of healthy infants (up to 50%) will be positive for *C. difficile* toxin.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B test was compared with the tissue culture test at three U.S. hospitals and in-house at TECHLAB®, Inc. Specimens included in the evaluation were submitted to the clinical laboratory for routine testing. The tissue culture test was done according to the in-house procedure. The table below shows a summary of the clinical performance of the Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B test. The test exhibited a sensitivity and specificity of 90.2% and 99.7%, respectively. The predictive positive and negative values were 98.6% and 97.9%, respectively, and the correlation was 98.0%.

TABLE 1. Correlation of the Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B test with tissue culture.

N = 842	Tissue Culture positive	Tissue Culture negative
Sure-Vue® <i>C. difficile</i> TOX A/B test positive	138	2
Sure-Vue® <i>C. difficile</i> TOX A/B test negative	15	687
		95% CI
Sensitivity	90.2%	84.1 - 94.2
Specificity	99.7%	98.8 - 99.9
Predictive Positive Value	98.6%	94.4 - 99.8
Predictive Negative Value	97.9%	96.4 - 98.7
Correlation	98.0%	97.8 - 98.2

Of the 2 tissue culture-negative/Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B-positive samples, 1 was negative in a commercial toxin A+B ELISA. Of the 15 specimens that were tissue culture-positive/Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B-negative, 12 were negative in commercial toxin A+B ELISAs. There were 9 specimens that were unreadable. All of the specimens were negative by PCR analysis for the genes of toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*).

A total of 51 fecal specimens diluted in Cary Blair and 32 fecal specimens diluted in C&S Transport Media were tested in the Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B test and the results were compared to those obtained by routine testing. The test exhibited an

agreement of 97.6% for the detection of *C. difficile* toxins in specimens prepared in Transport Media.

ANALYTICAL SENSITIVITY

The test was consistently positive at a concentration of 0.63ng/mL for toxin A and 1.25 ng/mL for toxin B.

REPRODUCIBILITY

The reproducibility of the Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B test was determined using known positive (n=6) and negative (n=2) fecal specimens that were coded and sorted to prevent their identification during testing. Testing was performed on-site at 3 laboratories, which tested the samples on 3 days. The samples produced the expected results 100% of the time.

CROSS REACTIVITY

Fecal specimens inoculated with the following microorganisms to a final concentration of approximately 10⁸ or higher organisms per mL did not react in the Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B.

Bacteria: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii* (nontoxicogenic), *Clostridium sporogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 0157 H7, *Escherichia coli* ETEC, *Klebsiella pneumoniae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowans), *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*

Viruses: Adenovirus types 1,2,3,5,40,41, Human coronavirus, Coxsackievirus B2,B3,B4,B5, Echovirus 9,11,18,22,33, Enterovirus type 68,69,70,71.

The only non-*C. difficile* organism to react with the Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B was *C. sordellii* VPI 9048. This strain produces toxins HT and LT, which are homologous to toxins A and B, respectively.

INTERFERING SUBSTANCES

The following substances had no effect on test results when present in feces in the concentrations indicated: mucin (3.5% w/v), human blood (40% v/v), barium sulfate (5% w/v), Imodium® (5% w/v), Kaopectate® (5mg/mL), Pepto-Bismol® (5% w/v), steric/palmitic acid (40% w/v), Metronidazole (0.25% w/v), Vancomycin (0.25% w/v).

REFERENCES

1. Lyerly, D. M., H. C. Krivan, and T. D. Wilkins. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. 1:1-18.
2. Lyerly, D. M., K. E. Saum, D. K. MacDonald, and T. D. Wilkins. 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. Infect. Immun. 47: 349-352.
3. Borriello, S. P., F. E. Barclay, A. R. Welch, J. M. Ketley, T. J. Mitchell, J. Stephen, and G. E. Griffin. 1985. Host and microbial determinants of the spectrum of *Clostridium difficile* mediated gastrointestinal disorders. Microecol. Ther. 15:231-236.
4. Lyerly, D. M., N. M. Sullivan, and T. D. Wilkins. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Clostridium difficile* toxin A. J. Clin. Microbiol. 17:72-78.
5. Laughon, B. E., R. P. Viscidi, S. L. Gdovin, R. H. Yolken, and J. G. Bartlett. 1984. Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. J. Infect. Dis. 149: 781-788.
6. Lyerly, D. M., L. A. Barroso, and T. D. Wilkins. 1992. Characterization of a toxin A-/toxin B+ isolate of *Clostridium difficile*. Infect. Immun. 60: 4633-4639.
7. Dove, C. H., S.-Z. Wang, S. B. Price, C. J. Phelps, D. M. Lyerly, T. D. Wilkins, and J. L. Johnson. 1990. Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. Infect. Immun. 58: 480-488.

CLIA Complexity

Moderate

For Technical Assistance: 1-800-257-9525



Fisher HealthCare

For customer service, call 1-800-640-0640.
To fax an order, use 1-800-290-0290.
To order online: www.fisherhealthcare.com

©Sure-View is a trademark of Fisher Scientific Company.

Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B

ESPAÑOL

Test rápido para la detección de las toxinas A y B de *C. difficile* en muestras fecales
Prod. No. 23900550 (25 Pruebas)

Pendiente de Patente

USO PREVISTO

El test Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B es un test de inmunoensayo rápido para la detección de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* en muestras fecales de personas de las que se sospecha una enfermedad por *C. difficile*. El test debe utilizarse como una ayuda para el diagnóstico de la enfermedad causada por *C. difficile* y los resultados deben evaluarse siempre junto con los antecedentes del paciente.

Para uso diagnóstico *in vitro*.

FUNDAMENTO

Después del tratamiento con antibióticos, muchos pacientes sufren problemas gastrointestinales que varían entre diarrea leve y colitis pseudomembranosa grave. Una gran parte de los casos más leves de enfermedad gastrointestinal y la mayoría de los casos de colitis pseudomembranosa están causados por cepas toxigénicas de *Clostridium difficile* (1). Este microorganismo es una bacteria anaerobia oportunista que crece en el intestino cuando la flora normal está alterada por el antibiótico. Las cepas toxigénicas de *C. difficile* son portadoras de los genes que codifican las toxinas, mientras que las cepas no toxigénicas no contienen estos genes de toxinas. La enfermedad está causada por las toxinas que produce el microorganismo toxigénico. Se cree que los síntomas clínicos asociados a la enfermedad están causados principalmente por la toxina A, una enterotoxina que lesiona los tejidos (2,3). *C. difficile* también produce una segunda toxina, denominada toxina B. La toxina B, que se ha denominado como la citotoxina del microorganismo, se detecta mediante los análisis de cultivos tisulares utilizados actualmente en numerosos laboratorios. Las cepas toxigénicas de *C. difficile* producen ambas toxinas o sólo la toxina B (4-7).

PRINCIPIO DEL TEST

El test Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B utiliza anticuerpos específicos para las toxinas A y B de *C. difficile*. El dispositivo contiene una *Ventana de reacción* con dos líneas verticales con anticuerpos inmovilizados (Fig. 1a). La línea de test ("T") contiene anticuerpos frente a las toxinas A y B de *C. difficile*. La otra es una línea de control ("C") y contiene anticuerpos frente a las IgG. El *Conjugado* contiene anticuerpos frente a las toxinas A y B unidos a peroxidasa de rábano picante. Para realizar el test, la muestra se añade a un tubo que contiene una mezcla de *Diluyente* y *Conjugado*. La mezcla muestra-conjugado diluida se añade al *Pocillo de muestra* y el dispositivo se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Durante la incubación, las toxinas A y B presentes en la muestra se unen al conjugado de anticuerpo antitoxina-peroxidasa. Los complejos toxina-anticuerpo migran a través de un filtro almohadillado y alcanzan una membrana en la que son captados por los anticuerpos antitoxina inmovilizados en la línea. A continuación, la *Ventana de reacción* se lava con *Solución tampón de lavado* y el test se desarrolla con la adición del *Substrato*. Tras una incubación de 10 minutos, se comprueba visualmente en la reacción "T" la aparición de una línea azul vertical en el lado "T" de la *Ventana de reacción*. La presencia de una línea azul indica un resultado positivo. Una reacción positiva "C", indicada por una línea azul vertical en el lado "C" de la *Ventana de reacción*, confirma que el test funciona adecuadamente y los resultados son válidos.

MATERIALES SUMINISTRADOS

Dispositivos de membrana (Membrane Devices) – 25 bolsas, cada una con 1 dispositivo y un desecante

Diluyente (Diluent) (14mL) – Solución tamponada proteínica con tiomersal al 0,02% con cuentagotas graduado

Tampón de lavado (Wash Buffer) (10mL) – Solución tamponada con tiomersal al 0,02% con cuentagotas graduado

Substrato (Substrate) (3.5mL) – Solución con tetrametilbenzidina

Conjugado (Conjugate) (2mL) – Anticuerpo monoclonal de ratón específico para la toxina A unido a peroxidasa de rábano picante y anticuerpo policlonal de cabra específico para la toxina B unido a peroxidasa de rábano picante en una solución de proteínas tamponada con tiomersal al 0,02%

Control positivo (Positive Control) (1mL) – Antígeno en una solución tamponada de proteínas

Pipetas de plástico desechables – 50 (graduadas a 25µL y 400µL)

MATERIALES Y EQUIPAMIENTO NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Tubos de ensayo pequeños (p. ej., tubos de plástico Eppendorf) *Palitos aplicadores*

Cronómetro

Mezclador de tipo vórtex

Guantes desechables para manipular las muestras fecales

Pipeta y puntas de pipeta

TIEMPO DE VALIDEZ Y CONSERVACIÓN

La fecha de caducidad del kit se indica en la etiqueta. Las fechas de caducidad de cada componente se indican en las etiquetas individuales. El kit debe conservarse a una temperatura entre 2 y 8 °C.

PRECAUCIONES

1. No deben mezclarse los reactivos de kits diferentes. No utilice los kits después de la fecha de caducidad.
2. ¡ANTES DEL USO atempere todos los componentes hasta alcanzar la TEMPERATURA AMBIENTE!
3. Los tapones, las puntas y los cuentagotas están codificados con colores y NO deben mezclarse.
4. No congele los reactivos. El kit debe conservarse a una temperatura entre 2 y 8 °C.
5. La bolsa con el *Dispositivo de membrana* debe estar a temperatura ambiente antes de la apertura y se abrirá justo antes del uso. Mantenga secos los dispositivos de membrana antes del uso.
6. Las muestras fecales deben analizarse en un plazo no superior a 72 horas desde su recogida para obtener resultados óptimos. En las muestras congeladas puede perderse la actividad de la toxina por los procesos de congelación y descongelación.
7. No pueden utilizarse las muestras conservadas en formol al 10%, formol mertiolato, formol acetato sódico o alcohol polivinílico.
8. Pueden utilizarse las muestras en medios de transporte, como los medios Cary Blair o C&S, de la forma especificada en el protocolo de preparación de las muestras.
9. Cuando añada los reactivos, sujete los frascos de los reactivos en posición vertical con el fin de asegurar que el tamaño de las gotas sea consistente.
10. Las muestras y los dispositivos de membrana deben manipularse y eliminarse después del uso como materiales biológicos potencialmente peligrosos. Utilice guantes desechables para realizar el test.
11. Los reactivos contienen tiomersal como conservante y deben manipularse siguiendo

las normas habituales de precaución de laboratorio.

12. Los dispositivos de membrana no pueden volver a utilizarse.
13. El test se ha optimizado para mejorar la sensibilidad y la especificidad. La modificación del procedimiento especificado o las condiciones del test puede alterar la sensibilidad y la especificidad del test. No se desvíe del procedimiento especificado.
14. La contaminación microbiana de los reactivos puede menoscabar la precisión del análisis. Evite la contaminación microbiana de los reactivos utilizando pipetas estériles desechables cuando extraiga alícuotas de los frascos de reactivos.
15. Preste atención al tiempo total del análisis cuando se realice el test con más de una muestra fecal. Añada primero el *Diluyente* y, a continuación, añada el *Conjugado* a cada tubo de *Diluyente*. A continuación, añada la muestra al tubo de *Diluyente/Conjugado*. Mezcle bien todas las muestras diluidas y, a continuación, transfíralas al *dispositivo de membrana*. El paso de incubación de 15 minutos comienza después de que se haya transferido la última mezcla muestra-conjugado diluida al *dispositivo de membrana* final.

RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS FECALES

1. Los procedimientos internos estándar habituales de recogida y transporte de las muestras fecales son adecuados. Las muestras deben conservarse a una temperatura entre 2 y 8 °C. Siempre que sea posible, las muestras se procesarán en las 24 posteriores a su recogida.
2. Almacene las muestras congeladas ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) si el test no puede realizarse en las 72 horas siguientes a la recogida de la muestra, pero tenga en cuenta que el congelado y el descongelado de la muestra pueden provocar la pérdida de actividad por la degradación de las toxinas.
3. Es necesario asegurarse de que las muestras estén completamente mezcladas ANTES de realizar el análisis.
4. NO se recomienda conservar las muestras fecales en el *Diluyente*.
5. No permita que las muestras fecales permanezcan en el *Diluyente* y/o el *Conjugado* durante un periodo de tiempo prolongado.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. Espere hasta que todos los reactivos y el número de dispositivos necesarios estén a temperatura ambiente antes de su uso.
2. Asigne e identifique un tubo de ensayo pequeño para cada muestra y controles externos opcionales según sea necesario.
3. Añada 500 μL de *Diluyente* a cada tubo de muestras fecales utilizando el cuentagotas negro graduado (o equivalente). En el caso de las muestras en medios de transporte como Cary Blair o C&S, añada 425 μL de *Diluyente* al tubo.
4. Añada una gota de *Conjugado* (frasco con tapón rojo) a cada tubo.
5. Obtenga una pipeta de plástico desechable (suministrada con el kit) para cada muestra – las pipetas tienen las graduaciones de 25 μL y 400 μL .
6. Mezcle bien todas las muestras independientemente de su consistencia- es muy importante obtener una suspensión homogénea de las muestras antes de transferirlas.
Muestras líquidas/semisólidas – pipetee 25 μL de muestra con una pipeta (graduada a 25 μL y 400 μL) y añádala en la mezcla de *Diluyente/Conjugado*. Utilice la misma pipeta para mezclar la muestra diluida.
Muestras formes/sólidas – Es preciso tener cuidado para añadir el volumen correcto de heces formes a la mezcla de muestra. Mezcle bien la muestra con un palito aplicador de madera y transfiera una porción pequeña (aproximadamente de 2mm de diámetro, el equivalente de 25 μL) de la muestra en la mezcla de *Diluyente/Conjugado*.

Emulsione la muestra con el palito aplicador.

Muestras fecales en medios de transporte Cary Blair o C&S - pipeteo 100µL de muestra en la mezcla de *Diluyente/Conjugado*.

7. **Muestras opcionales de control externo:**

Control positivo externo – añada una gota de *Control positivo* (frasco con tapón gris) al tubo de ensayo adecuado.

Control negativo externo – añada 25µL de *Diluyente* al tubo de ensayo adecuado.

NOTA: Si se transfiere muy poca muestra o si la muestra no se mezcla y se suspende completamente en la mezcla de Diluyente, puede obtenerse un resultado falso negativo del test. Si se añade una cantidad excesiva de heces, los resultados podrían invalidarse al disminuir el flujo de la muestra.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

1. Obtenga un *dispositivo de membrana* por muestra y un dispositivo para el control positivo o negativo externo opcional según sea necesario. Las bolsas de papel de aluminio que contienen los dispositivos deben alcanzar la temperatura ambiente antes de abrirlas. Identifique los dispositivos de forma apropiada y oriéntelos en una superficie plana de forma que la letra “C” del dispositivo se encuentre a la izquierda, la letra “T” se encuentre a la derecha y el *Pocillo de muestra* pequeño se encuentre en la esquina superior derecha del dispositivo (Fig. 1a).
2. Cierre cada tubo de muestra diluida y mézclelo bien. Mezcle adecuadamente con el vórtex o invirtiendo el tubo. Vaya inmediatamente al paso n° 3.
3. Utilice una pipeta (graduada en 25µL y 400µL), transfiera 400µL de la mezcla de muestra-conjugado diluida en el *Pocillo de muestra* (orificio más pequeño en la esquina superior derecha del dispositivo) de un *dispositivo de membrana* y asegúrese de que expulsa la muestra líquida en la almohadilla de absorción del interior del *dispositivo de membrana*.
4. Incube el dispositivo a temperatura ambiente durante 15 minutos – la muestra se absorberá a través del dispositivo y el área húmeda se extenderá en la *Ventana de reacción* (orificio más grande situado en el centro del dispositivo).

NOTA RELATIVA A LAS MUESTRAS QUE NO MIGRAN:

Ocasionalmente, no es posible realizar el ensayo porque la muestra fecal diluida obstruye las membranas y la Ventana de reacción no se humedece adecuadamente. Si la muestra fecal diluida no migra adecuadamente 5 minutos después de haber añadido la muestra al Pocillo de muestra (es decir, la membrana de la Ventana de reacción no parece estar completamente húmeda), añada 100µL (4 gotas) de Diluyente al Pocillo de muestra y espere otros 5 minutos (hasta un total de 20 minutos).

5. Después de la incubación, añada 300µL de *Solución tampón de lavado* a la *Ventana de reacción* utilizando el cuentagotas blanco graduado (o equivalente). Deje que la *Solución de lavado* penetre en la membrana de la *Ventana de reacción* y se absorba completamente.
6. Añada 2 gotas de *Substrato* (frasco con tapón azul) a la *Ventana de reacción*. Lea y anote los resultados visualmente después de 10 minutos.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

1. La interpretación del test es más fiable cuando se lee el dispositivo inmediatamente después del periodo de reacción. Lea el dispositivo a una distancia normal en una zona bien iluminada. Visualice el resultado en la línea de visión directamente sobre el dispositivo.

2. Observe la aparición de una línea azul en el lado “C” de la *Ventana de reacción* que representa la línea de control positivo interno. Observe la aparición de una línea azul en el lado “T” de la *Ventana de reacción* que representa la línea de test. El color de las líneas puede ser débil o intenso.
3. **Resultado positivo:** Un resultado positivo puede interpretarse en cualquier momento entre la adición del *Substrato* y el tiempo de lectura de 10 minutos. Se observan dos líneas azules: la línea de control (“C”) y la línea de test (“T”). El color de las líneas puede ser débil o intenso. La aparición de una línea azul en el lado “T” y una línea de control azul se interpreta como un resultado positivo. Una línea parcial visible se interpreta como un resultado positivo. No interprete la decoloración de la membrana o una sombra como un resultado positivo. Un resultado positivo indica la presencia de las toxinas de *C. difficile*.
4. **Resultado negativo:** Un test no puede interpretarse como negativo o inválido hasta 10 minutos después de la adición del *Substrato*. Se observa una sola línea azul en el lado de control (“C”) de la *Ventana de reacción* y no se observa una línea de test en el lado “T” de la *Ventana de reacción* (Fig. 1b). Un resultado negativo indica que la toxina de *C. difficile* está ausente en la muestra o por debajo del límite de detección del test.
5. **Resultado no válido:** Se observa una sola línea en el lado del test (“T”) de la *Ventana de reacción* o no se observan líneas en la *Ventana de reacción* (Fig. 1c, 1d). El resultado del test no es válido si no se encuentra presente una línea de control al terminar el periodo de reacción.

FIGURA 1: INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE Sure-Vue® C. difficile TOX A/B

Ventana de reacción
Pocillo de muestra

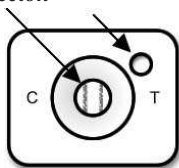


Fig. 1a. Positivo

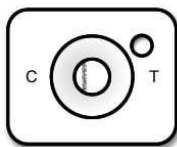


Fig. 1b. Negativo

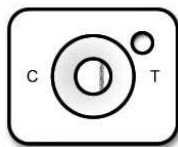


Fig. 1c. Nulo

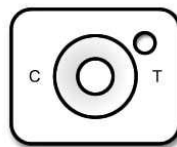


Fig. 1d. Nulo

CONTROL DE CALIDAD

Interno: Debe observarse una línea azul de control en el lado “C” de la *Ventana de reacción* en cada *dispositivo de membrana*. La aparición de la línea azul de control confirma que se han añadido correctamente la muestra y los reactivos, que los reactivos estaban activos durante la realización del análisis y que la mezcla ha migrado adecuadamente a través del *Dispositivo de membrana*. Un fondo transparente en el área de resultados se considera como un control negativo interno. Si el test se ha realizado adecuadamente y los reactivos funcionan correctamente, el fondo será transparente para dar un resultado apreciable.

Externo: La reactividad del test Sure-Vue® C. difficile TOX A/B debe comprobarse al recibir el kit con el *Control positivo* y el control negativo (*Diluyente*). El *Control positivo* se suministra con el kit (frasco con tapón gris). El *Control positivo* se utiliza para verificar la reactividad de los otros reactivos del ensayo y su objetivo no es asegurar la

precisión del punto de corte del ensayo. El *Diluyente* se utiliza para el control negativo. Pueden realizarse tests adicionales con los controles para cumplir los requisitos administrativos locales, regionales o federales y/o organismos de acreditación.

LIMITACIONES

1. El test Sure-Vue® *C. difficile* Tox A/B se utiliza para detectar toxina(s) de *C. difficile* en muestras fecales. El test confirma la presencia de toxina en heces y esta información debe tenerla en cuenta el médico junto con la anamnesis y la exploración física del paciente. El test Sure-Vue® *C. difficile* Tox A/B detecta niveles de la toxina A a ≥ 0.63 ng/mL y de la toxina B a ≥ 1.25 ng/mL.
2. Las muestras fecales son muy complejas. Los resultados óptimos del test Sure-Vue® *C. difficile* Tox A/B se obtienen con muestras recogidas en las 24 horas previas. La mayoría de las muestras no diluidas pueden conservarse entre 2 y 8 °C durante 72 horas antes de que se produzca una degradación significativa de las toxinas. Si las muestras no se pueden analizar en este período de tiempo, se pueden congelar y descongelar después. Sin embargo, si las muestras se congelan y descongelan varias veces, puede perderse la inmunoreactividad de las toxinas A y B.
3. En algunas muestras pueden obtenerse reacciones débilmente positivas. Esto puede deberse a diversos factores como la presencia de niveles bajos de toxina, la presencia de sustancias fijadoras o enzimas inactivadoras en las heces. *En estas condiciones, el test debe realizarse con una muestra fresca.* Otros tests adicionales que pueden utilizarse junto con el test Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B son los cultivos con tests toxigénicos o ensayos de citotoxicidad en cultivos tisulares para detectar la presencia de *C. difficile* o sus toxinas.
4. No pueden utilizarse las muestras fecales conservadas en formol al 10%, formol meriolato, formol acetato sódico o alcohol polivinílico.
5. El test Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B es un test cualitativo. La intensidad del color no debe interpretarse cuantitativamente.
6. Algunos aislados de *C. sordellii* pueden reaccionar con el test Sure-Vue® *C. difficile* Tox A/B por la producción de toxinas inmunológicamente relacionadas (1).
7. En niños se han descrito índices de colonización de hasta el 50%. Se ha descrito también un elevado índice de colonización en pacientes con fibrosis quística (1,3).

VALORES ESPERADOS

La incidencia de la enfermedad asociada al *C. difficile* en pacientes con diarrea asociada al uso de antibióticos es del 10% al 20%. En nuestros estudios, la incidencia varió entre el 10% y el 22%. La prevalencia de un test Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B positivo varía entre las localizaciones y en los hospitales pueden observarse tasas inferiores o superiores a las observadas en los laboratorios incluidos en esta evaluación. La enfermedad por *Clostridium difficile* es, sobre todo, una enfermedad nosocomial que afecta a pacientes de edad avanzada y los hospitales con cifras elevadas de pacientes ancianos pueden observar tasas más elevadas. Es importante interpretar cualquier resultado junto con los síntomas clínicos, porque en algunos adultos sanos y un gran número de niños sanos (hasta el 50%) se obtienen resultados positivos para la toxina de *C. difficile*.

CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO

Se comparó el test Sure-Vue® *C. difficile* TOX A/B con cultivos celulares en tres hospitales de Estados Unidos e internamente en TECHLAB®, Inc. Las muestras incluidas en la evaluación se remitieron al laboratorio clínico para su análisis rutinario. El test de los cultivos tisulares se realizó de acuerdo con el protocolo interno. En la siguiente tabla se

muestra un resumen del funcionamiento clínico del test Sure-Vue® C. difficile TOX A/B. El test demostró una sensibilidad y una especificidad del 90.2% y del 99.7%, respectivamente. Los valores pronósticos positivos y negativos fueron del 98.6% y del 97.9%, respectivamente, y la correlación fue del 98.0%.

Tabla 1. Correlación del test Sure-Vue® C. difficile TOX A/B con cultivos tisulares.

N = 842	Cult. tisul. pos.	Cult. tisul. neg
Sure-Vue® C. difficile TOX A/B positivo	138	2
Sure-Vue® C. difficile TOX A/B negativo	15	687

		95% CI
Sensibilidad	90.2	84.1 - 94.2
Especificidad	99.7	98.8 - 99.9
Valor pronóstico positivo	98.6	94.4 - 99.8
Valor pronóstico negativo	97.9	96.4 - 98.7
Correlación	98.0	97.8 - 98.2

De las dos muestras negativas para el cultivo tisular/positivas para Sure-Vue® C. difficile TOX A/B, 1 fue negativa con un test ELISA A+B comercializado. De las 15 muestras que fueron positivas para el cultivo tisular/negativas para Sure-Vue® C. difficile TOX A/B, 12 fueron negativas con tests ELISA A+B comercializado. Hubo 9 muestras que no pudieron leerse. Todas las muestras fueron negativas mediante la reacción en cadena de la polimerasa de los genes de la toxina A (*tdcA*) y la toxina B (*tdcB*).

Se analizó un total de 51 muestras fecales diluidas en Cary Blair y 32 muestras fecales diluidas en medio de transporte C&S con el test Sure-Vue® C. difficile TOX A/B y se compararon los resultados con los obtenidos mediante análisis rutinarios. El test presentó una concordancia del 97.6% en la detección de las toxinas de *C. difficile* en muestras preparadas en medios de transporte.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

El test fue consistentemente positivo a una concentración de 0.63ng/mL de la toxina A y 1.25ng/mL de la toxina B.

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del test Sure-Vue® C. difficile TOX A/B se determinó con muestras fecales positivas (n=6) y negativas (n=2) que se codificaron y clasificaron para evitar que se identificasen durante el análisis. El análisis se realizó en 3 laboratorios que analizaron las muestras durante 3 días. Las muestras produjeron los resultados esperados en todos los casos.

REACTIVIDAD CRUZADA

Las muestras fecales inoculadas con los siguientes microorganismos a una concentración final de aproximadamente 10⁸ o superior de organismos por mL no reaccionaron con el test Sure-Vue® C. difficile TOX A/B:

Bacterias: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii* (no toxigénico), *Clostridium sporogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* EIEC, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 0157 H7, *Escherichia*

coli ETEC, *Klebsiella pneumoniae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowans), *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*

Virus: tipos 1,2,3,5,40 y 41 del adenovirus, coronavirus humano, virus Cocksackie B2,B3,B4,B5, virus Echo 9,11,18,22,33, tipos 68,69,70,71 del enterovirus.

El único organismo no *C. difficile* que reaccionó con el test Sure-Vue® *C. difficile* Tox A/B fue *C. sordellii* VPI 9048. Esta cepa produce las toxinas HT y LT, que son homólogas a las toxinas A y B, respectivamente.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias no influyeron en los resultados del test cuando se encontraban presentes en las heces en las concentraciones indicadas: mucina (3.5% p/v), sangre humana (40% v/v), sulfato de bario (5% p/v), Imodium® (5% p/v), Kaopectate® (5mg/mL), Pepto-Bismol® (5% p/v), ácido estérico/palmitico (40% p/v), metronidazola (0.25% p/v), vancomicina (0.25% p/v).

REFERENCIAS

1. Lyerly, D. M., H. C. Krivan, and T. D. Wilkins. 1988. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. 1:1-18.
2. Lyerly, D. M., K. E. Saum, D. K. MacDonald, and T. D. Wilkins. 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. Infect. Immun. 47: 349-352.
3. Borriello, S. P., F. E. Barclay, A. R. Welch, J. M. Ketley, T. J. Mitchell, J. Stephen, and G. E. Griffin. 1985. Host and microbial determinants of the spectrum of *Clostridium difficile* mediated gastrointestinal disorders. Microecol. Ther. 15:231-236.
4. Lyerly, D. M., N. M. Sullivan, and T. D. Wilkins. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Clostridium difficile* toxin A. J. Clin. Microbiol. 17:72-78.
5. Laughon, B. E., R. P. Viscidi, S. L. Gdovin, R. H. Yolken, and J. G. Bartlett. 1984. Enzyme immunoassays for detection of *Clostridium difficile* toxins A and B in fecal specimens. J. Infect. Dis. 149: 781-788.
6. Lyerly, D. M., L. A. Barroso, and T. D. Wilkins. 1992. Characterization of a toxin A-/toxin B+ isolate of *Clostridium difficile*. Infect. Immun. 60: 4633-4639.
7. Dove, C. H., S.-Z. Wang, S. B. Price, C. J. Phelps, D. M. Lyerly, T. D. Wilkins, and J. L. Johnson. 1990. Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. Infect. Immun. 58: 480-488.

Grado de complejidad conforme a la CLIA

Moderada

Para asistencia técnica: 1-800-257-9525



Fisher HealthCare

Para el servicio de cliente, llamada 1-800-640-0640.
Para enviar por telefax una orden, uso 1-800-290-0290.
Para ordenar en línea: www.fisherhealthcare.com