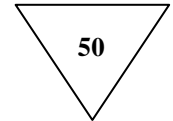




REF

M41 MICROGEN™ C. DIFFICILE



IVD

GB

INTENDED USE

Microgen™ C. difficile is a rapid latex agglutination test intended for confirmatory identification of *Clostridium difficile* cultured on selective solid media from faecal samples from patients with suspected pseudomembranous colitis, antibiotic-associated diarrhoea and post-operative diarrhoea. The kit is intended for professional laboratory use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

Latex particles are coated with rabbit IgG antibodies specific for C. difficile cell wall antigens. When the sensitised latex particles are mixed with a suspension of C. difficile colonies, a sensitive and specific immunochemical reaction takes place causing the finely dispersed latex particles to agglutinate rapidly into aggregates that are easily visible to the unaided eye.

CONT

KIT PRESENTATION

REAG	TEST
------	------

M41a Test Latex Reagent: 2.5mL

Latex particles coated with rabbit antibodies to C. difficile antigens. Preserved with 0.099% sodium azide. (Blue cap)

CONTROL	+
---------	---

M41b Positive Control: 0.5mL

Suspension of inactivated C. difficile antigens reactive with Test Latex Reagent. Preserved with 0.099% sodium azide. (Black cap)

NaCl	0.85%
------	-------

M40 0.85% Isotonic Saline: 5mL

Preserved with 0.099% sodium azide. (White cap)

Instructions for Use

Disposable agglutination slides
Disposable mixing sticks

Additional Requirements:

- Bacteriological loops
- C. difficile selective agar plates (CCFA or CCEY)

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Safety:

1. The reagents supplied in this kit are for *in vitro* diagnostic use only
2. Sodium azide, which is used as a preservative in the kit reagents can react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. Dispose by flushing with a large volume of water to prevent azide build-up.
3. Appropriate precautions should be taken when handling or disposing of potential pathogens. Decontamination of infectious material can be achieved with sodium hypochlorite at a final concentration of 3% for 30 minutes. Liquid waste containing acid must be neutralised before treatment.
4. The positive control has been inactivated during the manufacturing process. However, it should be handled as though potentially infectious.

Procedural:

1. Microgen™ C. difficile should be used according to the kit instructions.
2. Allow all reagents to reach room temperature before use.
3. Do not dilute any of the kit reagents
4. Do not intermix reagents from different batches of kits.
5. Do not freeze any of the kit reagents
6. Do not allow the latex reagent dropper to touch the positive control or bacterial samples.
7. Ensure the agglutination slide is clean and dry prior to use.
8. The kit should not be used if the latex reagent fails to agglutinate with the positive control, or if the latex reagent agglutinates in isotonic saline only. Replace with a new kit.

STORAGE AND SHELF LIFE

Microgen™ C. difficile should be stored at 2-8°C when not in use. The kit should not be used after the expiry date printed on the carton label.

SPECIMENS

Isolates derived from faecal samples should be cultured on selective medium (CCFA or CCEY) anaerobically at 37°C for 48 hours. Colonies with morphology resembling C. difficile are removed for testing with Microgen™ C. difficile (see below). The use of alcohol shock prior to plating is useful to remove other non-spore forming faecal organisms.

PROCEDURE

Quality Control:

The following checks should be performed each time the kit is used to confirm that the reagents are functioning correctly:

1. **Reagent Control**
Add 1 drop of Microgen™ C. difficile Latex Reagent to 1 drop of isotonic saline in the same circle on an agglutination slide. Mix with a mixing stick and observe for agglutination. No agglutination should be seen. If this control shows agglutination, at least one of the reagents is contaminated and they should be discarded.
2. **Positive Control**
Gently mix the Positive Control by inverting several times. Place 1 drop on a circle of an agglutination slide. Add 1 drop of Microgen™ C. difficile Latex Reagent to the same circle and mix. Agglutination should be visible within 2 minutes. If no agglutination is seen the reagents should be discarded.

Test Procedure:

1. Dispense 1 drop of isotonic saline on to 1 circle of a clean, dry Microgen™ agglutination slide.
2. Using an inoculating loop, remove a suspected C. difficile colony from the selective agar plate. Only select colonies whose morphology resembles that of C. difficile. Emulsify the colony in the drop of saline on the test card to produce a heavy, smooth suspension.
3. Observe the suspension for any agglutination or clumping which would indicate auto-agglutination. If the suspension remains smooth, proceed to the next step. **If auto-agglutination is seen, the organism cannot be tested using Microgen™ C. difficile. Alternative test methods should be used.**

- Gently mix the Test Latex Reagent by inverting the vial several times. Add 1 drop to the colony suspension on the slide. **Do not allow the dropper to touch the organism suspension.**
- Mix the latex reagent and organism suspension together with a clean mixing stick for 30 seconds. Continue mixing by rocking the slide.
- Examine for agglutination after 2 minutes from initial mixing of latex and sample.
- After reading, discard the used slides and mixing sticks into suitable disinfectant.

INTERPRETATION

Agglutination within 2 minutes is a positive result and indicates the presence of *C. difficile*.
No agglutination within 2 minutes is a negative result.

LIMITATIONS OF USE

- Results should be interpreted by the clinician in the context of all available clinical and laboratory information. The isolation of *C. difficile* does not constitute a diagnosis of pseudomembranous colitis or antibiotic-associated diarrhoea.
- Identification of *C. difficile* using Microgen™ *C. difficile* should be performed on cultures grown on selective media as this increases the isolation rate or from a purity plate such as FAA.
- Other *Clostridium spp* may occasionally grow on selective agars. However, they can be distinguished from *C. difficile* by culture on CCEY agar or CCFA with egg yolk supplement, where they will fluoresce under a UV light but not produce a halo in the media.
- Culture-derived suspensions which auto-agglutinate cannot be tested by Microgen™ *C. difficile*. Alternative methods should be used.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Microgen™ *C. difficile* has been evaluated as a culture confirmation test at both an independent UK microbiology laboratory and in-house. In total, 137 bacterial isolates were cultured on selective agar plates and colonies tested by Microgen™ *C. difficile* and a well-established commercially available test.

		Microgen™ <i>C. difficile</i>		
		+ve	-ve	Total
Commercial test	+ve	85*	0	85
	-ve	0	52**	52
Total		85	52	137

Sensitivity: 85/85 = 100%
Specificity: 52/52 = 100%
Diagnostic Efficiency: 137/137 = 100%

*Of the 85 isolates in this group, 18 were cross-reactants in both tests. However, 16 of these either will not grow on *C. difficile* selective medium or the colonies do not resemble *C. difficile*. The remaining two isolates (both *C. glycolicum*) will grow slightly but do not exhibit colony fluorescence which is a characteristic of the majority of *C. difficile* strains.

** 2 of these isolates were classified as *C. difficile* (serogroups A9, A10). One of these (serogroup A10) exhibited slightly irregular colony morphology. The remaining 50 isolates comprised a wide variety of bacterial species including 5 *Clostridium spp*. Most of these isolates either do not grow on *C. difficile* selective agar or exhibit atypical colony morphology.

Overall, the results obtained with Microgen™ *C. difficile* correlate closely with those obtained using the established commercial product. Although a number of organisms have the potential to cause false positive reactions in both tests, they either do not grow in *C. difficile* selective culture media or their colony morphologies are not typical of *C. difficile*.

REPRODUCIBILITY

Intra-batch reproducibility was established by testing one batch of product on three separate occasions using a different operator for each occasion. Sensitivity was tested using serial dilutions of reference and kit control antigens and specificity was confirmed using a QC organism panel. No substantial differences were seen between the results obtained by the three operators.

Inter-batch reproducibility was examined by testing the sensitivity and specificity of three batches of product using reference and kit control antigens and the QC organism panel. No differences in sensitivity or specificity were seen between the three batches of product.

D

ZWECKBESTIMMUNG

Microgen™ *C. difficile* ist ein schneller Latexagglutinationstest, der zur bestätigenden Identifikation von *Clostridium difficile*-Erregern bestimmt ist, die auf ausgewählten festen Medien mit Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf pseudomembranöse Kolitis, Antibiotika-assoziierte Diarrhö und postoperative Diarrhö kultiviert worden sind. Das Kit sollte nur von Fachpersonal zu Laborzwecken verwendet werden.

TESTPRINZIP

Latexpartikel sind mit Kaninchen-IgG-Antikörpern beschichtet, die für *C. difficile*-Zellwandantigene spezifisch sind. Wenn die sensibilisierten Latexpartikel mit einer Lösung aus *C. difficile*-Kolonien gemischt werden, findet eine sensitive und spezifische Immunreaktion statt, die dazu führt, dass die fein verteilten Latexpartikel schnell in Aggregate agglutinieren, die mit dem bloßen Auge leicht zu erkennen sind.

CONT

INHALT DES KITS

REAG

TEST

M41a Test-Latexreagenz: 2,5 ml

Latexpartikel behandelt mit Kaninchen-Antikörpern gegen *C. difficile* - Antigene. Konserviert mit 0,099 % Natriumazid. (**Blauer** Verschluss)

CONTROL

+

M41b Positivkontrolle: 0,5ml

Suspension inaktivierter *C. difficile*-Antigene, die mit Test-Latexreagenz reagieren. Konserviert mit 0,099 % Natriumazid. (**Schwarzer** Verschluss)

NaCl

0.85%

M40 0,85 % isotonische Kochsalzlösung: 5ml

Konserviert mit 0,099 % Natriumazid. (**Weißer** Verschluss)

Gebrauchsanweisung
Einwegobjektträger für die Agglutination
Einwegrührstäbchen

Zusätzlich werden benötigt:

- Bakterienösen
- C. difficile*-selektive Agarplatten (CCFA oder CCEY)

WARNHINWEISE UND SICHERHEITSVORKEHRUNGEN

Sicherheit:

- Die Reagenzien in diesem Kit sind nur für die *In-vitro*-Diagnostik gedacht.
- Natriumazid, das als Konservierungsmittel für die Reagenzien verwendet wird, kann mit in Abflussinstallationen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Anreicherung von explosiven Metallaziden führen. Bei Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen, um eine Anreicherung des Azids zu vermeiden.
- Beim Umgang oder der Beseitigung von potenziellen Pathogenen sollten entsprechende Sicherheitsvorkehrungen

- getroffen werden. Die Dekontamination infektiösen Materials kann mit Natriumhypochlorit bei einer Endkonzentration von 3 % über 30 Minuten erfolgen. Flüssige Abfallstoffe, die Säuren enthalten, müssen vor der Behandlung neutralisiert werden.
- Die Positivkontrolle wurde während des Herstellungsprozesses inaktiviert. Trotzdem sollte dieses Produkt als potenziell infektiös behandelt werden.

Anwendung:

- Microgen™ C. difficile sollte gemäß der Gebrauchsanweisung benutzt werden.
- Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung Raumtemperatur haben.
- Keines der Reagenzien im Kit darf verdünnt werden.
- Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht miteinander vermischt werden.
- Keines der Reagenzien im Kit darf eingefroren werden.
- Die Latexreagenzflasche sollte nicht mit der Positivkontrolle oder den Bakterienproben in Berührung kommen.
- Vergewissern Sie sich, dass der Objektträger vor der Verwendung sauber und trocken ist.
- Das Kit sollte nicht verwendet werden, wenn das Latexreagenz nicht mit der Positivkontrolle agglutiniert, oder wenn das Latexreagenz nur in isotoner Kochsalzlösung agglutiniert. Durch ein neues Kit ersetzen.

AUFBEWAHRUNG UND HALTBARKEIT

Microgen™ C. difficile sollte bei Nichtverwendung bei 2-8°C gelagert werden. Das Kit darf nach dem Verfallsdatum auf dem Verpackungsetikett nicht mehr benutzt werden.

PROBEN

Aus Stuhlproben gewonnene Isolate sollen auf einem selektiven Medium (CCFA oder CCEY) anaerob bei 37°C 48 Stunden lang kultiviert werden. Kolonien mit einer C. difficile-ähnlichen Morphologie werden zum Testen mit Microgen™ C. difficile entfernt (siehe unten). Die Anwendung eines Alkoholschocks vor dem Ausbringen auf Platten ist nützlich, um andere, nicht sporenbildende Fäkalorganismen zu entfernen.

VERFAHREN

Qualitätskontrolle:

Die folgenden Prüfungen müssen jedes Mal, wenn das Kit verwendet wird, durchgeführt werden, um zu bestätigen, dass die Reagenzien richtig wirken:

- Reagenzienkontrolle:**
Einen Tropfen Microgen™ C. difficile Latexreagenz zu einem Tropfen der isotonen Kochsalzlösung in dieselbe Vertiefung auf dem Objektträger geben. Mit einem Rührstäbchen mischen und auf Agglutination achten. Es sollte keine Agglutination zu sehen sein. Wenn diese Kontrolle Agglutination aufweist, ist mindestens eines der Reagenzien kontaminiert und alle Reagenzien sollten entsorgt werden.
- Positivkontrolle**
Die Positivkontrolle durch mehrmaliges Schütteln vorsichtig mischen. Einen Tropfen auf eine Vertiefung auf dem Agglutinationsträger geben. Einen Tropfen von Microgen™ C. difficile Latexreagenz in dieselbe Vertiefung geben und vermischen. Agglutination sollte innerhalb von 2 Minuten auftreten. Falls keine Agglutination sichtbar wird, sollten die Reagenzien entsorgt werden.

Testverfahren:

- 1 Tropfen der isotonen Kochsalzlösung in 1 Vertiefung eines sauberen, trockenen Microgen™ Agglutinationsobjektträgers geben.
- Mit einer Impföse eine vermutete C. difficile-Kolonie aus der selektiven Agarplatte entnehmen. Nur Kolonien mit C. difficile-ähnlicher Morphologie auswählen. Die Kolonie in dem Tropfen der Kochsalzlösung auf der Testkarte emulgieren, um eine dickflüssige, glatte Suspension zu erzeugen.

- Die Suspension auf Agglutination oder Verklumpen beobachten, was auf eine Autoagglutination deutet. Wenn die Suspension glatt bleibt, zum nächsten Schritt übergehen. **Wenn Autoagglutination beobachtet wird, kann der Organismus nicht mit Microgen™ C. difficile untersucht werden. Es sollten alternative Testmethoden verwendet werden.**
- Das Test-Latexreagenz durch mehrmaliges Schütteln des Fläschchens vorsichtig mischen. Einen Tropfen zu Koloniesuspension auf dem Träger geben. **Die Tropfenflasche darf nicht mit der Organismussuspension in Berührung kommen.**
- Das Latexreagenz und die Organismussuspension mit einem sauberen Rührstäbchen 30 Sekunden lang mischen. Das Mischen durch Schwenken des Trägers fortsetzen.
- 2 Minuten nach Beginn des anfänglichen Mischens von Latexreagenz und Probe auf Agglutination untersuchen.
- Nach dem Ablesen die benutzten Rührstäbchen und Objektträger in geeigneter Desinfektionslösung entsorgen.

INTERPRETATION

Eine Agglutination innerhalb von 2 Minuten entspricht einem positiven Ergebnis und deutet auf die Anwesenheit von C. difficile hin. Keine Agglutination innerhalb von 2 Minuten ist ein negatives Ergebnis.

ANWENDUNGSBESCHRÄNKUNGEN

- Die Ergebnisse sollten durch den Arzt immer im Kontext aller vorhandenen klinischen und Laborparameter interpretiert werden. Die Isolierung von C. difficile stellt keine Diagnose einer pseudomembranösen Kolitis oder einer Antibiotika-assoziierten Diarrhö dar.
- Die Identifikation von C. difficile mithilfe von Microgen™ C. difficile sollte auf Kulturen durchgeführt werden, die auf selektiven Medien gewachsen sind, da dies die Isolierungsrate erhöht, oder von einer Reinheitsplatte wie FAA..
- Gelegentlich können andere Clostridium spp auf selektiven Agaren wachsen. Sie können jedoch durch Kultivierung auf CCEY-Agar oder CCFA mit Eigelb-Supplement, wo sie unter UV-Licht fluoreszieren, aber in den Medien keinen Hof bilden, von C. difficile unterschieden werden.
- Kulturabgeleitete Suspensionen mit Autoagglutination können nicht mit Microgen™ C. difficile untersucht werden. Es sollten alternative Testmethoden verwendet werden.

LEISTUNGSDATEN

Microgen™ C. difficile ist als Kulturbestätigungstest in sowohl einem unabhängigen Mikrobiologielabor in Großbritannien als auch intern bewertet worden. Insgesamt wurden 137 Bakterienisolate auf selektiven Agarplatten kultiviert und die Kolonien mit Microgen™ C. difficile und einem bewährten kommerziell erhältlichen Test untersucht.

		Microgen™ C. difficile		Gesamt
		Pos	Neg	
Kommerzieller Test	Pos	85*	0	85
	Neg	0	52**	52
Gesamt		85	52	137

Sensitivität: 85/85 = 100%
Spezifität: 52/52 = 100%
Diagnostische Effizienz: 137/137 = 100%

* Von den 85 Isolaten dieser Gruppe haben 18 in beiden Tests kreuzreagiert. 16 dieser Isolate wachsen jedoch entweder nicht auf C. difficile-selektivem Medium oder die Kolonien ähneln C. difficile nicht. Die restlichen beiden Isolate (beide C. glycolicum) wachsen beide leicht, zeigen jedoch keine Koloniefloreszenz, was eine Eigenschaft der Mehrheit der C. difficile-Stämme ist.

** 2 dieser Isolate wurden als C. difficile klassifiziert (Serogruppen A9, A10). Eine davon (Serogruppe A10) zeigte eine leicht unregelmäßige

Koloniemorphologie. Die restlichen 50 Isolate umfassten eine breite Auswahl bakterieller Spezies einschließlich 5 *Clostridium spp.* Die meisten dieser Isolate wuchsen entweder nicht auf *C. difficile*-selektivem Agar oder zeigen eine atypischen Koloniemorphologie.

Insgesamt korrelieren die mit Microgen™ *C. difficile* erzielten Ergebnisse eng mit den mit dem bewährten kommerziellen Produkt erhaltenen Ergebnissen. Obgleich eine Reihe von Organismen das Potenzial besitzen, eine falsch-positive Reaktion in beiden Tests zu erzeugen, wuchsen sie entweder nicht auf *C. difficile*-selektiven Kulturmedien oder ihre Koloniemorphologien sind für *C. difficile* nicht typisch.

REPRODUZIERBARKEIT

Die **Intrachargenreproduzierbarkeit** wurde durch Testen einer Produktcharge in drei separaten Durchgängen mit unterschiedlichem Bedienpersonal untersucht. Die Sensitivität wurde mit Verdünnungsreihen von Referenz- und Kit-Kontrollantigenen getestet, und die Spezifität wurde mit einer QK-Organismengruppe bestätigt. Es wurden keine wesentlichen Unterschiede zwischen den von den drei Bedienpersonen erzielten Ergebnissen festgestellt.

Die **Interchargenreproduzierbarkeit** wurde durch Testen der Sensitivität und der Spezifität von 3 Produktchargen unter Verwendung von Referenz- und Kit-Kontrollantigenen und der QK-Organismengruppe untersucht. Es wurden keine Unterschiede in Sensitivität oder Spezifität zwischen den drei Produktchargen festgestellt.

ES

Procedimiento:

1. Microgen™ *C. difficile* se deberá utilizar según las instrucciones del kit.
2. Espere que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.
3. No diluya ninguno de los reactivos del kit.
4. No mezcle entre sí los reactivos de diferentes lotes del kit.
5. No congele ninguno de los reactivos del kit.
6. No deje que el gotero del reactivo de látex toque el control positivo ni las muestras bacterianas.
7. Asegúrese de que la lámina de aglutinación esté limpia y seca antes de su uso.
8. El kit no se deberá usar si el reactivo de látex no se aglutina con el control positivo o si el reactivo de látex se aglutina sólo en solución salina isotónica. Reemplácelo por un kit nuevo.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

Microgen™ *C. difficile* se deberá almacenar a una temperatura de 2 a 8 °C cuando no se utilice. El kit no se deberá usar después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta de la caja.

MUESTRAS

Las cepas aisladas de muestras fecales se deberán cultivar en placas de agar selectivo anaerobio (CCFA o CCEY) a 37°C durante 48 horas.

Las colonias con morfología similar a la de *C. difficile* se eliminan para analizar con Microgen™ *C. difficile* (vea más adelante). Se utiliza un shock de alcohol previo a la siembra en placa para eliminar otros organismos fecales que no son capaces de formar esporas.

PROCEDIMIENTO

Control de calidad:

Cada vez que se utilice el kit, se deberán hacer las siguientes comprobaciones, para confirmar que los reactivos funcionan correctamente:

1. *Control de reactivo*

Añada una gota de Reactivo de Látex Microgen™ *C. difficile* a una gota de solución salina isotónica en el mismo círculo, en la lámina de aglutinación.

Mezcle con una varilla para mezclar y observe la presencia de aglutinación. No se deberá observar aglutinación. Si este control muestra aglutinación, por lo menos uno de los reactivos está contaminado y deberá ser desechado.

2. *Control positivo*

Mezcle con cuidado el Control Positivo, invirtiéndolo varias veces. Coloque una gota en un círculo de una lámina de aglutinación. Añada una gota de Reactivo de Látex Microgen™ *C. difficile* en el mismo círculo, y mezcle. La aglutinación se deberá hacer visible en un lapso de dos minutos. Si no se observa aglutinación, los reactivos deben ser desechados.

Procedimiento de la prueba:

1. Coloque una gota de solución salina isotónica en un círculo de una lámina de aglutinación Microgen™ limpia y seca.
2. Con un asa de inoculación, elimine una colonia de *C. difficile* sospechosa de la placa de agar selectivo. Seleccione únicamente las colonias con morfología similar a la de *C. difficile*. Emulsifique la colonia en la gota de solución salina de la tarjeta de prueba, para producir una suspensión pesada y lisa.
3. Observe la presencia de aglutinación o grumos en la suspensión, lo que indicaría una autoaglutinación. Si la suspensión se mantiene lisa, proceda al siguiente paso. **Si no se observa autoaglutinación, el microorganismo no puede ser analizado con Microgen™ *C. difficile*. Se deberá usar otro método de análisis.**
4. Mezcle con cuidado Reactivo de Látex de Prueba, invirtiéndolo varias veces. Añada una gota a la suspensión de colonia de la lámina. **No deje que el gotero toque la suspensión del microorganismo.**
5. Mezcle el reactivo de látex con la suspensión de microorganismo, con una varilla para mezclar limpia, durante 30 segundos. Continúe mezclando, balanceando la lámina.
7. Examine la presencia de aglutinación después de dos minutos de la mezcla inicial de látex con la muestra.
8. Después de la lectura, deseche las láminas usadas y las varillas para mezclar, con un desinfectante adecuado.

INTERPRETACIÓN

La aglutinación al cabo de dos minutos se considera un resultado positivo e indica la presencia de *C. difficile*.

La ausencia de aglutinación al cabo de dos minutos se considera un resultado negativo.

LIMITACIONES DE USO

1. Los resultados deberán ser interpretados por el clínico en el contexto de toda la información clínica y de laboratorio. El aislamiento de *C. difficile* no constituye un diagnóstico de colitis pseudomembranosa ni de diarrea asociada a antibióticos.
2. La identificación de *C. difficile* con el uso de Microgen™ se deberá realizar en cultivos que crezcan en medio selectivos, puesto que ello aumenta la tasa de aislamiento, o bien utilizando una placa de purificación según FAA.
3. En ocasiones, otras especies de *Clostridium* pueden crecer en agares selectivos. Sin embargo, éstas se pueden distinguir de *C. difficile* mediante el cultivo en agar CCEY o CCFA suplementado con clara de huevo, donde muestran fluorescencia bajo luz ultravioleta pero no producen halo en el medio.
4. Las suspensiones derivadas de cultivos que se autoaglutinan no se pueden analizar con Microgen™ *C. difficile*. Se deberá usar otro método de análisis.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se ha evaluado Microgen™ *C. difficile* como prueba de confirmación de cultivo, tanto en un laboratorio de microbiología independiente del Reino Unido, como internamente. En total, se cultivaron 137 aislados bacterianos en placas de agar selectivo y las colonias se analizaron mediante Microgen™ *C. difficile* y una prueba comercial bien establecida.

		Microgen™ C. difficile		
		Positivas	Negative s	Total
Prueba comercial	+ve	85*	0	85
	-ve	0	52**	52
Total		85	52	137

Sensibilidad: 85/85 = 100%
 Especificidad: 52/52 = 100%
 Eficacia diagnóstica: 137/137 = 100%

*De los 85 aislados de este grupo, 18 fueron reacciones cruzadas en ambas pruebas. Sin embargo, 16 de éstos no crecerán en medio selectivo para *C. difficile* o las colonias no se asemejan a las de *C. difficile*. Los dos aislados restantes (ambos *C. glycolicum*) crecerán ligeramente, pero no presentan fluorescencia de colonia, que es una característica de la mayoría de las cepas de *C. difficile*.

** Dos de estos aislados fueron clasificados como *C. difficile* (serogrupos A9, A10). Uno de éstos (serogrupo A10) presentó una morfología de colonia ligeramente irregular. Los 50 aislados restantes comprendieron una gran variedad de especies bacterianas incluidas cinco especies de *Clostridium*. La mayoría de estos aislados no crecen en agar selectivo para *C. difficile* o presentan unas colonias de morfología atípica.

En total, los resultados obtenidos con Microgen™ *C. difficile* se correlacionan estrechamente con los obtenidos con el producto comercial establecido. Aunque es posible que algunos microorganismos causen reacciones positivas falsas con ambas pruebas, no crecen en medio de cultivo selectivo para *C. difficile* o sus colonias tienen morfologías que no son las típicas de las de *C. difficile*.

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad intralote se estableció analizando un lote de producto en tres ocasiones distintas, con un técnico diferente en cada ocasión. La sensibilidad se analizó con diluciones seriadas de antígenos de referencia y de control del kit, y la especificidad se confirmó con un panel de microorganismo de control de calidad. No se observó ninguna diferencia considerable entre los resultados obtenidos por los tres operadores.

La reproducibilidad entre lotes se evaluó mediante el examen de la sensibilidad y la especificidad de tres lotes de producto, utilizando los antígenos de referencia y de control del kit, y con un panel de microorganismo de control de calidad. No se observó ninguna diferencia en cuanto a la sensibilidad o la especificidad entre los tres lotes de producto.

DESTINAZIONE D'USO

Microgen™ *C. difficile* è un test di agglutinazione al lattice per l'identificazione rapida del *Clostridium difficile* in campioni sottoposti a coltura su terreno solido selettivo, provenienti dalle feci di soggetti con sospetta colite pseudomembranosa, diarrea da antibiotici e diarrea post-operatoria. Il kit è ad uso esclusivo dei laboratori specializzati.

PRINCIPIO DEL TEST

Le particelle di lattice sono rivestite con IgG di coniglio specifiche per gli antigeni parietali del *C. difficile*. Quando le particelle di lattice sensibilizzate vengono mescolate con la sospensione contenente le colonie di *C. difficile*, si verifica una reazione immunochimica ad alta sensibilità e specificità, in seguito alla quale le particelle di lattice finemente disperse si agglutinano rapidamente in aggregati facilmente visibili ad occhio nudo.

CONT

CONTENUTO DEL KIT

REAG	TEST	
		M41a Reagente al lattice: 2,5 ml

Particelle di lattice rivestite con anticorpi di coniglio contro gli antigeni del *C. difficile*. Contiene lo 0,099% di sodio azide come conservante. (Cappuccio **blu**)

CONTROL	+	
		M41b Controllo positivo: 0,5 ml

Sospensione di antigeni inattivati di *C. difficile* reattivi al reagente al lattice. Contiene lo 0,099% di sodio azide come conservante. (Cappuccio **nero**)

NaCl	0,85%	
		M40 Soluzione salina isotonica allo 0,85%: 5 ml

Contiene lo 0,099% di sodio azide come conservante. (Cappuccio **Bianco**)

Istruzioni per l'uso
 Vetrini monouso per agglutinazione
 Bastoncini monouso per miscelazione

Attrezzatura supplementare:

- Anse batteriologiche
- Piastre di agar selettivo per il *C. difficile* (CCFA o CCEY)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Sicurezza:

1. I reagenti forniti nel kit sono esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.
2. La sodio azide utilizzata come conservante nei reagenti del kit può reagire con le tubature di piombo o di rame, formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Per lo smaltimento dei reagenti si raccomanda di far scorrere abbondante acqua, onde prevenire la formazione di azidi nei tubi.
3. Seguire le precauzioni adeguate nella manipolazione e nello smaltimento dei potenziali patogeni. Per decontaminare i materiali infetti utilizzare ipoclorito di sodio a una concentrazione finale del 3% per 30 minuti. Prima di essere trattati, i rifiuti liquidi contenenti acidi dovranno essere neutralizzati.
4. Anche se il controllo positivo è stato inattivato durante il processo di produzione, esso dovrà essere manipolato come materiale potenzialmente infetto.

Raccomandazioni:

1. Utilizzare Microgen™ *C. difficile* in base alle istruzioni fornite nel kit.
2. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.
3. Non diluire i reagenti contenuti nel kit.
4. Non mescolare tra loro reagenti provenienti da kit di lotti diversi.
5. Non congelare i reagenti contenuti nel kit.
6. Fare in modo che il contagocce del reagente al lattice non entri in contatto con il controllo positivo, né con i campioni batterici.
7. Prima dell'uso, verificare che il vetrino per l'agglutinazione sia pulito e asciutto.
8. Se il reagente al lattice non si agglutina una volta mescolato al controllo positivo, o si agglutina solo in soluzione salina isotonica, il kit non deve essere utilizzato. Sostituire con un nuovo kit.

CONSERVAZIONE E SCADENZA

Se non utilizzato, Microgen™ *C. difficile* deve essere conservato a 2-8 °C. Il kit non deve essere utilizzato oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta del cartone esterno.

CAMPIONI

Gli isolati provenienti dai campioni fecali devono essere messi a coltura in terreno selettivo (CCFA or CCEY) in ambiente anaerobico a 37 °C per 48 ore.. Le colonie che presentano una morfologia simile al *C. difficile* vengono prelevate per essere sottoposte al test con Microgen™ *C. difficile* (vedi oltre). Per rimuovere gli altri organismi fecali non sporigeni prima dell'inserimento in piastra, si può ricorrere al lavaggio alcolico..

PROCEDURA

Controllo di qualità:

Ogni volta che si utilizza un kit, è necessario effettuare i seguenti controlli, per verificare il corretto funzionamento dei reagenti:

1. Controllo del reagente

Versare 1 goccia di reagente al lattice Microgen™ *C. difficile* e 1 goccia di soluzione salina isotonica sul vetrino per agglutinazione, nello stesso cerchio. Mescolare con l'apposito bastoncino e osservare la reazione, che non deve dare luogo ad agglutinazione. La presenza di una reazione di agglutinazione indica che almeno uno dei reagenti è contaminato. In tal caso, eliminare i reagenti.

2. Controllo positivo

Mescolare con delicatezza il controllo positivo, capovolgendo a più riprese. Versarne 1 goccia in uno dei cerchi del vetrino per agglutinazione. Aggiungere nello stesso cerchio 1 goccia di reagente al lattice Microgen™ *C. difficile* e mescolare. Nell'arco di 2 minuti dovrebbe verificarsi la reazione di agglutinazione. Se la reazione non si verifica, eliminare i reagenti.

Procedura del test:

1. Versare 1 goccia di soluzione salina isotonica su uno dei cerchi di un vetrino per agglutinazione Microgen™ pulito e asciutto.
2. Servendosi di un'ansa per inoculazione, prelevare dalla piastra di agar selettivo una sospetta colonia di *C. difficile*. Scegliere solo le colonie la cui morfologia corrisponde a quella del *C. difficile*. Emulsionare la colonia nella goccia di soluzione salina sul vetrino, in modo da ottenere una sospensione densa e omogenea.
3. Osservare la sospensione. La presenza di agglutinazione o di aggregati indica un fenomeno di autoagglutinazione. Se la sospensione resta omogenea, procedere alla fase successiva **Se si riscontra autoagglutinazione, l'organismo non può essere testato mediante Microgen™ *C. difficile*. In tal caso sarà necessario ricorrere a metodi di saggio alternativi.**
4. Mescolare con delicatezza il reagente al lattice, capovolgendo il flacone a più riprese. Aggiungere 1 goccia alla sospensione contenente la colonia, precedentemente ottenuta sul vetrino. **Evitare che il contagocce entri in contatto con la sospensione contenente i microrganismi.**
5. Mescolare il reagente al lattice e la sospensione con un apposito bastoncino pulito per 30 secondi. Continuare a mescolare facendo oscillare il vetrino.
6. Controllare se si verifica agglutinazione nell'arco di 2 minuti, a partire dal momento in cui si è iniziato a mescolare il reagente con il campione.
7. Dopo la lettura, mettere da parte i vetrini e i bastoncini usati in un disinfettante adeguato.

INTERPRETAZIONE

Il manifestarsi di una reazione di agglutinazione nell'arco di 2 minuti corrisponde a un risultato positivo, e indica la presenza del *C. difficile*. L'assenza di agglutinazione nell'arco di 2 minuti corrisponde a un risultato negativo.

LIMITAZIONI D'USO

1. I risultati devono essere interpretati dal medico, in base a tutte le informazioni cliniche e di laboratorio disponibili.

L'isolamento del *C. difficile* non costituisce una diagnosi di colite pseudomembranosa o di diarrea da antibiotici.

2. L'identificazione del *C. difficile* mediante Microgen™ *C. difficile* deve essere effettuata su colture incubate in terreni selettivi, poiché ciò aumenta il tasso di isolamento, oppure su colture provenienti da piastre ad alta purezza, come le FAA..
3. Altre *Clostridium spp.* possono crescere talvolta in agar selettivo. È possibile però distinguerle dal *C. difficile* mediante coltura in agar CCEY o CCFA con aggiunta di tuorlo d'uovo. In tali condizioni, poste sotto una luce UV, esse risulteranno fluorescenti, senza però produrre aloni nel terreno di coltura..
4. Le colture in sospensione che producono un fenomeno di autoagglutinazione non possono essere testate mediante Microgen™ *C. difficile*. In tal caso sarà necessario utilizzare dei metodi alternativi.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Microgen™ *C. difficile* è stato valutato come test di conferma per colture sia da un laboratorio indipendente di microbiologia nel Regno Unito, sia mediante procedure interne. In totale venivano sottoposti a coltura in piastre di agar selettivo 137 isolati batterici, e le colonie venivano testate mediante Microgen™ *C. difficile* e altri test generalmente riconosciuti disponibili in commercio.

		Microgen™ <i>C. difficile</i>		
		+vo	-vo	Totale
Test disponibile in commercio	+vo	85*	0	85
	-vo	0	52**	52
Totale		85	52	137

Sensibilità: 85/85 = 100%
Specificità: 52/52 = 100%
Efficacia diagnostica: 137/137 = 100%

*18 degli 85 isolati di questo gruppo erano cross-reagenti in entrambi i test. Tuttavia, 16 di essi non crescevano su terreno selettivo per *C. difficile*, o le colonie non corrispondevano morfologicamente al *C. difficile*. Gli altri due isolati (entrambi di *C. glycolicum*) crescevano leggermente, ma non manifestavano la fluorescenza caratteristica della maggior parte dei ceppi di *C. difficile*.

** 2 di questi isolati venivano classificati come *C. difficile* (sierogruppi A9 e A10). Uno di essi (sierogruppo A10) presentava una colonia di morfologia leggermente irregolare. I restanti 50 isolati comprendevano un'ampia varietà di specie batteriche, comprese 5 *Clostridium spp.* La maggior parte di questi isolati non cresceva su agar selettivo per il *C. difficile*, oppure presentava una colonia con morfologia atipica.

Complessivamente i risultati ottenuti con Microgen™ *C. difficile* coincidevano quasi completamente con quelli rilevati con il test riconosciuto, disponibile in commercio. Sebbene una serie di microrganismi tenda potenzialmente a provocare delle reazioni di falso positivo in entrambi i test, tali organismi non crescono in terreni di coltura selettivi per il *C. difficile*, oppure la morfologia delle loro colonie non corrisponde a quella del *C. difficile*.

RIPRODUCIBILITÀ

La riproducibilità interna al lotto è stata verificata testando lo stesso lotto in tre diverse occasioni e utilizzando un operatore diverso ad ogni occasione. La sensibilità è stata testata mediante le diluizioni seriali di riferimento e gli antigeni di controllo del kit, mentre la specificità è stata confermata mediante una batteria di microrganismi per il controllo di qualità. Non sono state rilevate differenze significative tra i risultati ottenuti dai tre operatori.

La riproducibilità tra lotti diversi è stata verificata testando la sensibilità e la specificità di tre lotti di prodotto mediante gli antigeni di

riferimento e di controllo del kit e la batteria di microrganismi per il controllo di qualità. Non sono state rilevate differenze significative tra i tre lotti di prodotto, né in termini di sensibilità, né in termini di specificità.

F

UTILISATION PRÉVUE

Microgen™ C. difficile est un test par agglutination au latex rapide destiné à la confirmation de l'identification de *Clostridium difficile* cultivé sur des milieux solides sélectifs à partir d'échantillons de fèces provenant de patients chez qui une colite pseudomembraneuse, des diarrhées associées aux antibiotiques et des diarrhées post-opératoires sont suspectées. L'utilisation de ce kit est réservée exclusivement aux laboratoires professionnels.

PRINCIPE DU TEST

Les particules de latex sont revêtues d'anticorps IgG de lapin spécifiques des antigènes de la paroi cellulaire de *C. difficile*. Quand les particules de latex sensibilisées sont mélangées avec une suspension de colonies de *C. difficile*, une réaction immunochimique sensible et spécifique a lieu et provoque l'agglutination rapide des particules de latex finement dispersées pour former des agrégats facilement visibles à l'oeil nu.

CONT		PRÉSENTATION DU KIT	
REAG	TEST	Réactif Test Latex M41a :	2,5 ml
Particules de latex revêtues d'anticorps de lapin dirigés contre les antigènes de <i>C. difficile</i> . Conservateur : azide de sodium 0,099 % (Bouchon Bleu)			
CONTROL	+	Contrôle positif M41b :	0,5 ml
Réactif constitué d'une suspension d'antigènes de <i>C. difficile</i> inactivé dans du réactif Test Latex. Conservateur : azide de sodium 0,099 % (Bouchon Noir)			
NaCl	0.85%	Solution saline isotonique M40	0,85 % : 5 ml
Conservateur : azide de sodium 0,099 % (Bouchon Blanc)			

Mode d'emploi
Lames pour agglutination jetables
Tiges pour mélange jetables

Exigences supplémentaires

- Boucles bactériologiques
- Boîtes de Petrie sélectives pour *C. difficile* (CCFA ou CCEY)

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Innocuité :

1. Les réactifs fournis dans ce kit sont strictement destinés à usage diagnostique *in vitro*
2. L'azide de sodium, utilisé comme conservateur pour les réactifs du kit peut réagir avec le plomb ou le cuivre des canalisations pour former des azides métalliques potentiellement explosifs. Rejeter en rinçant avec un grand volume d'eau pour éviter l'accumulation d'azides.
3. Prendre les précautions appropriées lors de la manipulation ou de l'élimination des pathogènes potentiels. La décontamination des matières infectieuses peut être obtenues à l'aide d'hypochlorite de sodium à une concentration finale de 3 % pendant 30 minutes. Les déchets liquides contenant de l'acide doivent être neutralisés avant traitement.
4. Le contrôle positif a été inactivé pendant le processus de fabrication. Il doit cependant être manipulé comme s'il était potentiellement infectieux.

Procédure :

1. Microgen™ C. difficile doit être utilisé conformément aux instructions fournies avec le kit.
2. Laisser tous les réactifs revenir à température ambiante avant de les utiliser.
3. Ne pas diluer les réactifs du kit.
4. Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots de kits différents
5. Ne pas congeler les réactifs du kit.
6. Ne pas toucher le contrôle positif ou les échantillons bactériens avec le compte-gouttes du réactif Latex.
7. S'assurer que la lame d'agglutination est propre et sèche avant de l'utiliser.
8. Le kit ne doit pas être utilisé si le réactif Latex ne présente aucune agglutination avec le contrôle positif ou s'il présente une agglutination avec la solution saline isotonique seule. Remplacer par un nouveau kit.

STOCKAGE ET DURÉE DE CONSERVATION

Microgen™ C. difficile doit être conservé à 2-8 °C quand il n'est pas utilisé. Le kit ne doit pas être utilisé après la date de péremption imprimée sur l'étiquette de la boîte.

SPÉCIMENS

Les isolats dérivés d'échantillons fécaux doivent être cultivés sur un milieu sélectif (CCFA ou CCEY), anaérobie, à 37 °C pendant 48 heures. Les colonies présentant des ressemblances morphologiques avec *C. difficile* sont éliminées pour procéder au test avec Microgen™ C. difficile (voir ci-dessous). L'emploi d'un choc alcoolique avant étalement est utile pour éliminer les autres organismes fécaux ne formant pas des spores.

PROCÉDURE

Contrôle de qualité :

Les contrôles suivants doivent être réalisés à chaque utilisation du kit pour confirmer que les réactifs fonctionnent correctement :

1. Réactif de contrôle

Ajouter 1 goutte de Microgen™ C. difficile Réactif Latex à 1 goutte de solution saline isotonique dans le même cercle sur une lame d'agglutination. Mélanger avec une tige de mélange et observer l'agglutination. Aucune agglutination ne doit être observée. Si ce contrôle présente une agglutination, au moins un des réactifs est contaminé et ils doivent être jetés.

2. Contrôle Positif

Mélanger doucement le Contrôle positif par inversion à plusieurs reprises. Placer 1 goutte dans un cercle d'une lame d'agglutination. Ajouter 1 goutte de Microgen™ C. difficile Réactif Latex au même cercle et mélanger. Une agglutination doit être visible en 2 minutes. Si aucune agglutination n'est observée, les réactifs doivent être jetés.

Procédure de test :

1. Distribuer 1 goutte de solution saline isotonique sur 1 cercle d'une lame d'agglutination Microgen™ propre et sèche.
2. À l'aide d'une boucle d'inoculation, prélever une colonie suspecte de contenir des *C. difficile* de la boîte de Petrie sélective. Ne sélectionner que des colonies dont la morphologie ressemble à celle de *C. difficile*. Émulsionner la colonie dans la goutte de solution saline sur la carte de test pour obtenir une suspension épaisse et régulière.
3. Observer la suspension et rechercher toute agglutination ou agrégat qui pourrait indiquer une auto-agglutination. Si la suspension reste régulière, passer à l'étape suivante. **Si une auto-agglutination est observée, le micro-organisme ne peut pas être testé à l'aide de Microgen™ C. difficile. Des méthodes de test alternatives doivent être utilisées.**
4. Mélanger doucement le Réactif Latex par inversion à plusieurs reprises. Ajouter 1 goutte de la suspension de

colonie sur la lame. **Ne pas laisser le compte-gouttes toucher la suspension de micro-organisme.**

5. Mélanger le Réactif Latex et la suspension de micro-organisme avec une tige de mélange propre pendant 30 secondes. Poursuivre le mélange en faisant basculer la lame.
6. Rechercher l'agglutination 2 minutes après le mélange initial du latex et de l'échantillon.
7. Après lecture, jeter les lames et les tiges de mélange utilisées dans un désinfectant adapté.

INTERPRÉTATION

Une agglutination dans les 2 minutes constitue un résultat positif et indique la présence de *C. difficile*.
Aucune agglutination dans les 2 minutes constitue un résultat négatif.

LIMITES D'UTILISATION

1. Les résultats doivent être interprétés par un clinicien dans le contexte de toutes les informations cliniques et biologiques disponibles. L'isolement de *C. difficile* ne constitue pas un diagnostic de colite pseudomembraneuse ou de diarrhées associées aux antibiotiques.
2. L'identification de *C. difficile* à l'aide de Microgen™ *C. difficile* doit être réalisée soit sur des cultures ayant poussé sur des milieux sélectifs car cela accroît le taux d'isolement soit à partir d'une boîte ayant fait l'objet d'une purification par le FAA, par exemple.
3. D'autres *Clostridium spp* peuvent parfois croître sur des géloses sélectives. Cependant, on peut les distinguer de *C. difficile* par culture sur une gélose CCEY ou CCFA additionnée de jaune d'oeuf, où ils présentent une fluorescence sous les UV mais ne produisent pas de halo dans le milieu.
4. Les suspensions dérivées des cultures qui présentent une auto-agglutination ne peuvent pas être testées par Microgen™ *C. difficile*. Des méthodes de test alternatives doivent être utilisées.

PERFORMANCES

Microgen™ *C. difficile* a été évalué en tant que test de confirmation des cultures dans un laboratoire de microbiologie indépendant au Royaume-Uni et en interne. Au total, 137 isolats bactériens ont été cultivés sur des boîtes de gélose sélectives et les colonies ont été testées par Microgen™ *C. difficile* et un test binaire établi disponible dans le commerce.

		Microgen™ <i>C. difficile</i>		Total
		+ve	-ve	
Test disponible dans le commerce	+ve	85*	0	85
	-ve	0	52**	52
Total		85	52	137

Sensibilité : $85/85 = 100\%$
Spécificité : $52/52 = 100\%$
Efficacité diagnostique : $137/137 = 100\%$

*Sur les 85 isolats de ce groupe, 18 ont présenté des réactions croisées dans les deux tests. Cependant, 16 d'entre eux n'ont soit pas présenté de croissance sur le milieu sélectif pour *C. difficile* soit les colonies ne ressemblaient pas à celles de *C. difficile*. Les deux isolats restants (deux *C. glycolicum*) ont présenté une légère croissance mais pas de fluorescence des colonies qui constitue une caractéristique de la majorité des souches de *C. difficile*.

** 2 de ces isolats ont été classifiés comme *C. difficile* (sérogroupes A9, A10). L'un d'entre eux (sérogroupe A10) a présenté une morphologie des colonies légèrement irrégulière. Les 50 isolats restants comportaient une grande variété d'espèces bactériennes dont 5 *Clostridium spp*. La plupart de ces isolats soit n'ont pas

présenté de croissance sur une gélose sélective pour *C. difficile* soit ont présenté une morphologie atypique des colonies.

Globalement, les résultats obtenus avec Microgen™ *C. difficile* ont été en étroite corrélation avec ceux qui ont été obtenus à l'aide du produit disponible dans le commerce. Bien que de nombreux micro-organismes disposent du potentiel de provoquer des réactions faussement positives avec les deux tests, soit ils ne présentent pas de croissance sur les milieux de croissance sélectifs pour *C. difficile* soit les morphologies de leurs colonies ne sont pas typiques de *C. difficile*.

REPRODUCTIBILITÉ

La **reproductibilité entre les lots** a été établie en testant un lot de produit en trois occasions distinctes en employant un opérateur distinct à chaque occasion. La sensibilité a été testée en utilisant des dilutions en série des antigènes de référence et de contrôle du kit ; la spécificité a été confirmée en utilisant un panel de micro-organismes de CQ. Aucune différence substantielle n'a été observée entre les résultats obtenus par les trois opérateurs.

La **reproductibilité à l'intérieur d'un même lot** a été étudiée en testant la sensibilité et la spécificité de trois lots de produit à l'aide des antigènes de référence et de contrôle du kit et un panel de micro-organismes de CQ. Aucune différence n'a été observée en matière de sensibilité ou de spécificité entre les trois lots de produit.



Microgen Bioproducts Ltd
Unit 1, Watchmoor Point
Camberley
Surrey, GU15 3AD, UK

WF2600/09/2017(2)