



Gebrauchsanweisung
Instructions for use
Instructions d'utilisation
Instrucciones de uso
Istruzioni per l'uso
Instrukcja obsługi

NADAL[®]

C.difficile Toxin A&B Test

(test cassette)

REF 582003



Version 1.0

2011-01-11



nal von minden GmbH
Friedenstraße 32
D-93053 Regensburg

nal von minden GmbH
Carl-Zeiss-Str. 12
D-47445 Moers

nal von minden GmbH
Laan van Waalhaven 305
NL-2497 Den Haag

www.nal-vonminden.de
info@nal-vonminden.de

DE	Gebrauchsanweisung.....	3
EN	Instructions for use	5
FR	Instructions d'utilisation	7
E	Instrucciones de uso	9
I	Istruzioni per l'uso	11
PL	Instrukcja obsługi	13
	Symbols	15
	Contact	19

1. Verwendungszweck

Der NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test ist ein immunchromatografischer Schnelltest zum qualitativen Antigen-Nachweis von *Clostridium difficile* Toxin A und Toxin B im humanen Stuhlproben.

2. Einleitung und Diagnostische Bedeutung

Clostridium difficile ist eine der Hauptursachen antibiotika-assoziiierter Durchfallerkrankungen (Diarrhöe) oder pseudomembranöser Colitis. Es handelt sich bei dem Erreger um eines der derzeit am häufigsten nachgewiesenen Pathogene und eine wichtige Ursache für nosokomiale Infektionen in Krankenhäusern und Pflegeheimen.

Clostridium difficile wurde aus diversen natürlichen Lebensräumen isoliert, einschließlich Böden, Heu, Sand, dem Kot von verschiedenen großen Säugetieren (Kühe, Esel und Pferde) sowie den Fäkalien von Hunden, Katzen, Nagern und Menschen. *Cl. difficile* produziert mindestens drei potentielle Virulenz-Faktoren, von denen Toxin A und Toxin B als die wichtigsten Faktoren in der Pathogenese von mit *Cl. difficile* verbundenen Krankheiten angesehen werden.

Toxin A ist ein Enterotoxin, das mit dem Zytoskelet intestinaler Darmepithel-Zellen interferiert. Dabei wird die Funktionalität dieser Zellen zerstört. Toxin B ist ein Zytotoxin, das zu starken zytopathogenen Effekten in der Gewebekultur der Zell-Linien führt.

Da nicht alle Bakterienstämme von *Clostridium difficile* Toxine produzieren und ca. 2% der gesunden Erwachsenen sowie bis zu 50% der Kinder unterhalb von 2 Jahren mit *Clostridium difficile* kolonisiert sind, ist der Nachweise der Toxine (Toxin A und Toxin B) in den Stuhlproben von Patienten mit Diarrhöe aussagekräftiger, als die Bakterienkultur.

3. Testprinzip

Die NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Testkassette besteht aus einem Kunststoffgehäuse mit zwei verschiedenen Testbereichen mit Testmembranen für den getrennten Nachweis von *Clostridium difficile*-Toxin A oder *Clostridium difficile*-Toxin B. Ein gefärbter, an kolloidales Gold gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen *Cl. difficile*-Toxin A oder *Cl. difficile*-Toxin B ist jeweils im linken Endbereich der Membran aufgebracht.

Nachdem die Probennahme erfolgt ist, wird unter Verwendung des Extraktionsröhrchens (mit Extraktionsbuffer-Lösung) die Stuhlprobe aufgelöst. Jeweils 6 Tropfen dieses Extrakts werden in jede kreisrunde Probenöffnung der Testkassette gegeben.

Beim Durchfluss der extrahierten Probe durch den Absorptionsbereich der Membran bindet das auf der Membran aufgebraute markierte Antikörper-Farbstoff-Konjugat unter Ausbildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes an das Toxin A- oder Toxin B- Antigen (falls diese in der extrahierten Probe vorliegen).

Dieser Komplex bindet an den polyklonalen anti-Toxin A- oder anti-Toxin B- Antikörper, der in der Reaktionszone der Membran aufgebracht ist. Dies führt zur Ausbildung einer rosarot gefärbten Bande in der Reaktionszone. Wenn in der extrahierten Probe kein Toxin A oder Toxin B enthalten ist, erscheint keine Bande in der Reaktionszone.

Danach fließt die Reaktionsmischung weiter in die Kontrollzone der Membran. Nicht gebundenes Konjugat bindet an das Reagenz in der Kontrollzone und führt dort zur Ausbildung einer rosarot gefärbten Bande. Diese Bande zeigt an, dass die Reagenzien korrekt funktionieren.

4. Bestandteile der Testpackung

Jedes NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Testkit enthält Material zur Durchführung von 10 Tests:

- 10 NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Testkassetten
- 10 Einwegpipetten
- 10 Extraktionsröhrchen (gefüllt mit 2 ml Extraktionslösung)
- 10 Probenspatel
- 1 Packungsbeilage

5. Zusätzlich benötigte Materialien

- Stoppuhr
- Stuhlfänger

6. Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Alle NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Testbestandteile sollten in einem versiegelten Beutel bei Temperaturen zwischen 2°C und 30°C aufbewahrt werden. **Die Tests nicht einfrieren!** Das NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Testkit kann bis zum auf dem Etikett abgedruckten Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

7. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Der Test ist nur für den professionellen Gebrauch in der *in vitro* Diagnostik geeignet.
- Vor der Anwendung die Packungsbeilage sorgfältig durchlesen.
- Den Test nicht nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums, das auf der Verpackung abgedruckt ist, verwenden.
- Benutzen Sie keinen Test, dessen Schutzhülle beschädigt ist.
- Alle Reagenzien oder Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben in Kontakt kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt werden oder für ca. eine Stunde bei 121°C autoklaviert werden.

- Tragen Sie Schutzkleidung wie Laborkittel und Einweghandschuhe während der Untersuchung.
- Essen, rauchen oder trinken Sie nicht in den Bereichen, in denen mit Proben und dem Testkit gearbeitet wird.
- Vermeiden Sie jeglichen Kontakt zwischen den Händen und den Augen oder der Nase während der Probenentnahme und -testung.

8. Probennahme, -Vorbereitung und Lagerung

Einleitende Hinweise zu Probenvorbereitung und -lagerung

Stuhlproben sollten so schnell wie möglich nach dem Symptombeginn entnommen werden.

Verdünnte Proben müssen bei Temperaturen zwischen 2°C und 8°C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Bei der Lagerung bis zu 3 Tagen erfolgt keine Beeinträchtigung der Assay-Performance.

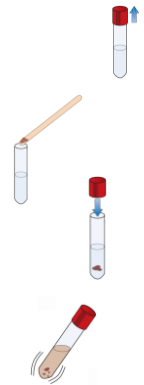
Für eine längere Aufbewahrung von unverdünnten Proben wird eine Temperatur von -20°C oder kälter empfohlen. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben könnte zu fehlerhaften Ergebnissen führen und sollte vermieden werden.

Achtung!

Sammeln Sie keine Proben in Behältern, die Medium, Konservierungsstoffe, tierisches Serum oder Reinigungsmittel (Detergentien) enthalten, da diese den Test beeinflussen könnten.

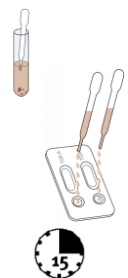
Durchführung der Probennahme

- 1) Kennzeichnen Sie das Extraktionsröhrchen mit dem Patientennamen und / oder der Kontrollnummer des Patienten.
- 2) Öffnen Sie das Röhrchen, indem Sie den roten Deckel nach oben abziehen.
- 3) Geben Sie in das Extraktionsröhrchen die Stuhlprobe hinein, indem Sie den Probenspatel verwenden:
 - Bei festem Stuhl etwa eine erbsengroße Probe
 - Bei flüssigem Stuhl 200 µl
- 4) Verschließen Sie das Extraktionsröhrchen, indem Sie den roten Deckel fest aufstecken.
- 5) Mischen Sie die Stuhlprobe mit der Extraktionslösung durch gründliches Schütteln des Extraktionsröhrchens, so lange bis sich die Probe auflöst.
- 6) Lassen Sie das Extraktionsröhrchen eine ausreichend lange Zeit stehen, um ein Absinken großer Partikel auf den Röhrchenboden zu ermöglichen. Alternativ können Sie die Probe auch bei 500-1000 RPM für eine Minute zentrifugieren.



9. Testdurchführung

- 1) Bringen Sie alle Reagenzien auf Raumtemperatur (15-30°C).
- 2) Öffnen Sie die Folienverpackung der Testkassette, indem Sie den Beutel an der vorgesehenen Trenn-Naht aufreißen und entnehmen Sie die Testkassette.
- 3) Öffnen Sie das Extraktionsröhrchen, indem Sie den roten Deckel nach oben abziehen und geben Sie die Einwegpipette in das Röhrchen. Füllen Sie die Einwegpipetten mit der Lösung.
- 4) Geben Sie mit Hilfe der Einwegpipette jeweils 6 Tropfen (200 µl) der extrahierten Lösung in jede der kreisrunden Probenöffnungen für TOX-A und TOX-B.
- 5) Lesen Sie das Testergebnis 15 Minuten nach der Probenzugabe in die Testkassette ab.



10. Testauswertung

Negativ

Es erscheint nur eine farbige Linie in der Kontrollzone (vor ‚TOX-A‘ bzw. ‚TOX-B‘), keine in der Testzone (nach Probenöffnung).



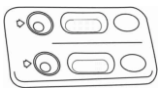
Positiv

Es erscheint eine farbige Linie in der Kontrollzone (vor ‚TOX-A‘ bzw. ‚TOX-B‘). Zusätzlich erscheint auch in der Testzone (nach Probenöffnung) eine deutlich sichtbare (!) Farbbande.



Ungültig

Wenn keine klare Linie in der Kontrollzone (vor ‚TOX-A‘ bzw. ‚TOX-B‘) ersichtlich wird, ist der Test ungültig. Wiederholen Sie den Test.



11. Qualitätskontrolle

Der Test beinhaltet eine interne Funktionskontrolle. Eine farbige Linie, die in der Kontrollzone erscheint zeigt an, dass der Test richtig durchgeführt wurde. Der Hintergrund kann sich jedoch beim Testen der Probe leicht rötlich verfärben, je nach Farbe der Stuhlprobe. Dies ist akzeptabel, solange es nicht die Auswertung der Testergebnisse beeinträchtigt.

12. Grenzen des Tests

- Der NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test wurde speziell für den Nachweis von *Cl. difficile* Toxin A oder Toxin B Antigenen in humanen Stuhlproben entwickelt.
- Wie bei jeder *in vitro* Diagnoseverfahren, sollte der Arzt das Testergebnis mit anderen klinischen Methoden bestätigen.
- Ein negatives Resultat schließt nicht automatisch eine Infektion mit *Cl. difficile* Toxinen aus. Ein solches Ergebnis kann durch proteolytische Verdauung der Toxine durch unsachgemäße Probenlagerung verursacht werden. Falls ein begründeter Verdacht für eine Infektion existiert, sollte eine zusätzliche Stuhlprobe geprüft werden.
- Ein positives Ergebnis schließt das Vorkommen anderer Pathogene nicht aus.
- In wenigen Fällen kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen, wenn die Stuhlprobe eine signifikante Menge an Blut enthält.
- Die Färbung der Test- und Kontrolllinien können je nach Erscheinungsbild der Stuhlprobe leicht wechseln. Zum Beispiel wurden dunkelgrüne Linien (anstatt pinker Linien) festgestellt, als grünliche oder dunkle Stuhlproben getestet wurden. Diese Stuhlfärbung erscheint, wenn ein Eisenmangel mit Eisenfumaraten behandelt wird. Das Testresultat sollte wie gewohnt beurteilt werden, d.h. zwei Linien für ein positives Ergebnis und eine Linie für ein negatives Ergebnis.

13. Leistungsmerkmale des Tests

Cl.difficile Toxin A

Analytische Sensitivität

Die Leistung des NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test wurde unter Verwendung eines Spektrums verdünnter Lösungen überprüft. Dabei wurde ein handelsübliches, kommerziell zur Verfügung stehendes gereinigtes Toxin A Antigen verwendet.

Der NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test ist in der Lage, eine Toxin A-Konzentration von 4 ng/ml nachzuweisen.

Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Es wurde mit 63 Stuhlproben eine Studie durchgeführt, indem der NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test mit der Zytotoxizitäts- und Zellkulturmethode verglichen wurde.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

		NADAL [®] Clostridium difficile Toxin A&B		Total
		+	-	
Zytotoxizität	+	13	2	15
	-	4	44	48
Total		17	46	63

Alle Proben zeigten identische Ergebnisse auf bei der Verwendung der Zytotoxizitäts- und Zellkulturmethode.

Aus der obigen Tabelle ist ersichtlich, dass die Sensitivität des NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test 86,7% (13/15) im Vergleich zur Zytotoxizitätsmethode beträgt und die Spezifität im Vergleich zur Zytotoxizitätsmethode bei 91,7% liegt.

Kreuzreaktionen

Der NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test hat durchweg ein negatives Ergebnis bis zu 500 ng/ml Toxin B aufgezeigt.

Cl.difficile Toxin B

Analytische Sensitivität

Die Leistung des NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test wurde unter Verwendung eines Spektrums verdünnter Lösungen überprüft. Dabei wurde ein handelsübliches, kommerziell zur Verfügung stehendes gereinigtes Toxin B Antigen verwendet.

Der NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test ist in der Lage, eine Toxin B-Konzentration von 5 ng/ml nachzuweisen.

Spezifität

Ein aufbereitetes *Cl. difficile* Toxin A Antigen wurde angewendet, um die Spezifität des Testes festzulegen. Der NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test hat durchweg negative Ergebnisse bis zu 500 ng/ml Toxin A angezeigt.

14. Referenzen

- 1) Lierly, D. M., H.C. Krivan, and T.D. Wilkins. 1988. Clostridium difficile: Its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. 1:1-18
- 2) Mulligan, M.E., L.R. Peterson, R.Y.Y. Kwok, C.R. Clabots, and D.N. Gerding. 1988. Immunoblots and plasmid fingerprints compared with serotyping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing Clostridium difficile. J. Clin. Microbiol. 26:41-31
- 3) Gilligan, P.H., L.R. McCarthy, and V.M. Genta. 1981. Relative frequency of Clostridium difficile in patients with diarrheal disease. J. Clin. Microbiol. 26:41-31
- 4) George, W.L. 1989. Antimicrobial agent-associated diarrhea and colitis, p661-678. In S.M. Finegold and W.L. George (ed.), Anaerobic infections in humans. Academic Press, Inc. New York.
- 5) Sullivan, N.M., Pellet S., and T.D. Wilkins. 1982. Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 35:1032-1040
- 6) Lierly, D.M., D.E. Lockwood, S.H. Richardson, and T.D. Wilkins. 1982. Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 35:1147-1150

Ref.: 2011-01-11 SW

1. Intended Use

The NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test is an immunochromatographic rapid test for the qualitative antigen detection of *Clostridium difficile* Toxin A and Toxin B in human feces.

2. Introduction and Clinical Significances

Clostridium difficile is a major cause of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. It is one of the most commonly detected pathogens and an important cause of nosocomial infections in hospitals and nursing homes.

The organism has been isolated from diverse natural habitats, including soils, hay, sand, dung from various large mammals (cows, donkeys and horses), and from dog, cat, rodent and human feces. *Cl. difficile* produces at least three potential virulence factors from which Toxin A and Toxin B are thought to be the most important in the pathogenesis of *Cl. difficile* associated diseases.

Toxin A is an enterotoxin which seems to interfere with the cytoskeleton of the intestinal epithelial cells, rendering them non functional while Toxin B is a cytotoxin that induces strong cytopathic effects in tissue cultures cell lines.

Since not all strains of *Clostridium difficile* produce toxins and approx. 2% of healthy adults as well as up to 50% of children younger than 2 years can be colonized with *Clostridium difficile*, the detection of the toxins (Toxin A and Toxin B) in stool samples of patients with diarrhea is more significant than culturing the bacteria.

3. Principle of the Test

The test device consists of a plastic housing containing two different sticks for the detection of *Cl. difficile* Toxin A or *Cl. difficile* Toxin B. A coloured anti *Cl. difficile* Toxin A or *Cl. difficile* Toxin B monoclonal antibody colloidal gold conjugate is placed at the left end of the membrane.

After collection in a tube containing the extraction solution, the feces sample is dissolved and few drops of this extract are added into each well of the reaction device.

As the test sample flows through the absorbent device, the labelled antibody-dye conjugate binds to the Toxin A or Toxin B antigen (when present in the sample), forming an antibody antigen complex.

This complex binds to the polyclonal anti-Toxin A or anti-Toxin B antibody in the positive reaction zone, producing a rose-pink coloured band.

In the absence of Toxin A or Toxin B, there is no line in the positive reaction zone. The reaction mixture continues flowing through the absorbent device, past the positive reaction zone and control zone.

Unbound conjugate binds to the reagent in the control zone producing a rose-pink coloured band demonstrating that the reagents are functioning correctly.

4. Reagents and Materials Supplied

Each NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Testkit contains everything needed to perform 10 tests:

- 10 NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B test cassettes
- 10 single use plastic pipettes
- 10 extraction tubes (filled with 2 mL of extraction solution)
- 10 sample applicators
- 1 instructions leaflet

5. Additional Required Materials

- Timer
- Stool collector

6. Storage & Stability

All NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test kit components should be stored in the sealed pouch at room temperature (between +2°C and +30°C). Do not freeze the test kit. The NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test kit is stable until the expiry date stated on the package label.

7. Warnings and Precautions

- This test is designed for *in vitro* diagnostic use and professional use only.
- Read carefully instructions leaflet before using this test.
- Do not use beyond the expiry date stated on the package label.
- Do not use a test from a damaged protective wrapper.
- All reagents and materials coming in contact with potential infectious specimens must be treated with appropriate disinfectants or autoclaved at 121°C for at least one hour.
- Wear protective clothing such as laboratory coats and disposable gloves while assaying samples.
- Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and kit reagents are handled.
- Avoid any contact between hands and eyes or nose during specimen collection and testing.

8. Specimen Collection and Preparation

Preliminary notes for specimen collection and storage

Stool specimen should be collected as soon as possible after onset of symptoms.

Diluted samples may be stored at +2°C to +8°C in refrigerator for 3 days without interference with assay performance.

For long term storage of undiluted specimens, storage at -20°C or colder is recommended. Repeated freezing and thawing of samples is not recommended and may cause erroneous results.

Caution!

Do not collect specimens in containers having media, preservatives, animal serum or detergents, as any of these may interfere with the test.

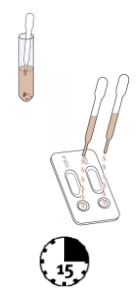
Procedure of specimen collection

- 1) Label the plastic tube containing the extraction solution with patient's name or control number.
- 2) Open the extraction tube.
- 3) Transfer stool sample into the extraction tube, using sample applicator:
 - volume of a pea, in case of solid stool
- 4) Close the extraction tube by tighten the red cap of the tube.
- 5) Mix the stool sample and the diluent by shaking well until the sample is dissolved.
- 6) Let the tube stand long enough for the large particles to settle to the bottom of the tube. Alternatively, centrifuge the tube at 500-1,000 RPM for 1 minute.



9. Procedure of the Test

- 1) Bring all reagents at room temperature (15-30°C).
- 2) Remove the test device from the pouch by tearing along the split.
- 3) Open the plastic tube containing the extracted sample.
- 4) Using the plastic pipette, add 6 drops (200 µl) of the extracted solution into each of the sample wells for TOX-A and TOX-B.
- 5) Read the test results 15 minutes after addition of the sample to the device.



10. Interpretation of the Results

Negative

Only one coloured band appears in the control zone. No band is visible in the test zone.



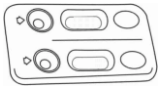
Positive

In addition to the control band, a clearly distinguishable band also appears in the test zone.



Invalid

If there is no distinct coloured band visible in the control zone, the test is inconclusive. Repeat the test.



11. Quality Control

A clear background in the observation window is considered an internal negative control. However, when the faecal sample is tested, the background may appear slightly reddish due to the original colour of the sample. This is acceptable as long as it does not interfere with the interpretation of test result. The test is invalid if the background fails to clear and obscures the reading of the result.

12. Limitations

- The NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test is specifically designed to detect Toxin A or Toxin B antigen in the stool samples.
- As for any *in vitro* diagnostic procedure, the physician should confirm the test results with other clinical methods.
- A negative result does not generally exclude a *Cl.difficile* infection. It can be caused by proteolytic digestion of the toxins due to improper specimen storage. If a reasonable suspicion of an infection exists, another stool specimen should be investigated.
- A positive result does not exclude the presence of other pathogens.
- The presence of blood in the feces samples in significant quantity may lead to false positive results in limited cases.
- Test and control lines colours may slightly change depending on the stool sample aspect. For example dark green lines (instead of pink lines) have been reported when assaying greenish or darkish stool samples. This stool coloration appears in case of treatment of iron deficiency with ferrous fumarate. The test result should be interpreted as usual, i.e. two lines for a positive result and one line for a negative result.

13. Performance Characteristics

Cl.difficile Toxin A

Analytical sensitivity

The performance of the NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test has been assayed, using a range diluted solutions prepared from a commercially available purified toxin A antigen. The NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test is able to detect a concentration of 4 ng/mL.

Diagnostic sensitivity and specificity

A study was performed on 63 feces samples, using the NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test test in comparison with the cytotoxicity and cell culture methods.

The results are summarized in the table 1:

		NADAL [®] Clostridium difficile Toxin A&B		Total
		+	-	
Cytotoxicity	+	13	2	15
	-	4	44	48
Total		17	46	63

All samples showed identical results using the cytotoxicity and the cell culture methods.

From the above table, the sensitivity of NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test test is 86.7% (13/15), compared to the cytotoxicity method and the specificity is 91.7% (44/48), compared to the cytotoxicity method.

Cross reaction

NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test showed consistently negative results up to 500 ng/mL Toxin B.

Cl.difficile Toxin B

Analytical sensitivity

The sensitivity of the NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test has been evaluated using a range of diluted solutions prepared from a commercially available purified *C. difficile* Toxin B antigen. Under these conditions, the detection limit of the NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test has been found to be 5 ng/mL.

Specificity

A purified *Cl. difficile* Toxin A antigen was used to determine the specificity of the test. NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B Test showed consistently negative results up to 500 ng/mL Toxin A.

14. References

- 1) Lierly, D, M, H.C. Krivan, and T.D. Wilkins. 1988. Clostridium difficile: Its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. 1:1-18
- 2) Mulligan, M.E., L.R. Peterson, R.Y.Y. Kwok, C.R. Clabots, and D.N. Gerding. 1988. Immunoblots and plasmid fingerprints compared with serotyping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing Clostridium difficile. J. Clin. Microbiol. 26:41-31
- 3) Gilligan, P.H., L.R. McCarthy, and V.M. Genta. 1981. Relative frequency of Clostridium difficile in patients with diarrheal disease. J. Clin. Microbiol. 26:41-31
- 4) George, W.L. 1989. Antimicrobial agent-associated diarrhea and colitis, p661-678. In S.M: Finegold and W.L. George (ed.), Anaerobic infections in humans. Academic Press, Inc. New York.
- 5) Sullivan, N.M., Pellet S., and T.D. Wilkins. 1982. Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 35:1032-1040
- 6) Lyerly, D.M., D.E. Lockwood, S.H. Richardson, and T.D. Wilkins. 1982. Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 35:1147-1150

Ref.: 2011-01-11 SW

1. Usage prévu

Le test NADAL® Clostridium difficile Toxine A&B est un test rapide immunochromatographique pour la détection qualitative de l'antigène de Clostridium difficile toxine A et toxine B dans les selles humaines.

2. Introduction et signification diagnostique

Clostridium difficile est l'une des causes principales de diarrhées secondaires à l'administration d'antibiotiques ou de colite pseudo-membraneuse. L'agent pathogène est actuellement le plus détecté et l'une des plus importantes causes d'infections nosocomiales dans les hôpitaux et les centres de soins.

Clostridium difficile a été isolé dans divers espaces vitaux dont les sols, le foin, le sable, les excréments de différents mammifères de grande taille (vaches, ânes, chevaux) ainsi que dans les matières fécales des chiens, des chats, des rongeurs et des humains. Cl. difficile produit au moins trois facteurs virulents potentiels dont la toxine A et la toxine B sont considérées comme les facteurs les plus importants de l'apparition des maladies liées à Cl. difficile.

La toxine A est une entérotoxine interférant avec le cytosquelette des cellules de l'épithélium intestinal. Le fonctionnement de ces cellules est alors détruit. La toxine B est une cytotoxine provoquant de forts effets cytopathogéniques dans la culture tissulaire des lignées cellulaires.

Étant donné que toutes les souches bactériennes de Clostridium difficile ne produisent pas de toxines et qu'environ 2% des adultes sains, ainsi que jusqu'à 50% des enfants de moins de 2 ans, sont colonisés par Clostridium difficile, la détection des toxines (toxine A et toxine B) dans les selles de patients souffrants de diarrhée est plus pertinente qu'une culture bactérienne.

3. Principe du test

La cassette NADAL® Clostridium difficile Toxine A&B est composée d'un boîtier en plastique avec deux zones de test distinctes avec des membranes pour la détection séparée de la toxine A de Clostridium difficile ou de la toxine B de Clostridium difficile. Un anticorps monoclonal coloré et conjugué à de l'or colloïdal dirigé contre la toxine A de Cl. difficile ou la toxine B de Cl. difficile est appliqué sur l'extrémité gauche de chaque membrane.

Une fois le recueil des échantillons réalisé, les selles sont dissoutes en utilisant le tube d'extraction (avec la solution d'extraction). 6 gouttes de cet extrait sont déposées dans chacun des puits de la cassette.

Lors de la migration de l'échantillon extrait le long de la zone absorbante de la membrane, le conjugué anticorps-colorant de la membrane se lie à l'antigène de la toxine A ou de la toxine B (si présent dans l'échantillon extrait) pour former un complexe anticorps-antigène.

Ce complexe se lie à l'anticorps polyclonal anti-toxine A ou anti-toxine B appliqué sur la zone de réaction de la membrane. Ceci conduit à la formation d'une ligne colorée dans la zone de réaction. Si aucune toxine A ou toxine B n'est présente dans l'échantillon extrait, aucune ligne n'apparaît dans la zone de réaction.

Ensuite, le mélange de réactifs continue de migrer vers la zone de contrôle de la membrane. Le conjugué qui n'a pas réagi se lie au réactif dans la zone de contrôle provoquant ainsi la formation d'une ligne colorée. Cette ligne indique que les réactifs ont fonctionné correctement.

4. Composants du test

Chaque kit NADAL® Clostridium difficile Toxine A&B comprend le matériel nécessaire à l'exécution de 10 tests :

- 10 cassettes NADAL® Clostridium difficile Toxine A&B
- 10 pipettes à usage unique
- 10 tubes d'extraction (remplis de 2 ml de solution d'extraction)
- 10 spatules
- 1 notice

5. Matériel supplémentaire nécessaire

- Chronomètre
- Collecteur de selles

6. Conservation et stockage des réactifs

Tous les composants du test NADAL® Clostridium difficile Toxine A&B doivent être conservés dans un sachet fermé et à une température entre 2°C et 30°C. **Ne pas congeler les tests !** Le kit NADAL® Clostridium difficile Toxine A&B peut être utilisé jusqu'à la date de conservation indiquée sur l'étiquette.

7. Avertissements et précautions

- Ce test est uniquement destiné à un usage professionnel pour le diagnostic *in vitro*.
- Lire soigneusement la notice avant l'exécution.
- Ne pas utiliser le test après expiration de la date limite de conservation indiquée sur l'emballage.
- Ne pas utiliser de test dont le sachet est endommagé.
- Tous les réactifs ou le matériel entré en contact avec des échantillons infectieux doivent être traités avec les désinfectants appropriés ou être autoclavés à 121°C pendant environ une heure.
- Porter des vêtements de protection comme une blouse de laboratoire et des gants à usage unique lors de l'analyse.

- Ne pas manger, fumer ni boire dans les zones où les échantillons et le test sont manipulés.
- Éviter tout contact avec les mains et les yeux ou le nez lors du recueil des échantillons et de leur analyse.

8. Recueil, préparation et conservation des échantillons

Remarque préliminaire sur la préparation et la conservation des échantillons

Si possible, recueillir les selles immédiatement après les premiers symptômes.

Les échantillons dilués doivent être conservés au réfrigérateur à une température entre 2°C et 8°C. La performance du test n'est pas diminuée pour une conservation jusqu'à 3 jours.

Pour une conservation de plus longue durée d'échantillons non dilués, une température de -20°C ou moins encore est conseillée. La congélation et décongélation répétée des échantillons peut provoquer des résultats erronés et doit alors être évitée.

Attention !

Ne pas recueillir d'échantillons dans des récipients contenant des milieux, des conservateurs, des sérums animaux ou des produits d'entretien (détergents) car ils pourraient influencer le résultat du test.

Exécution du recueil des échantillons

7) Indiquer le nom du patient et / ou la référence de contrôle du patient sur le tube d'extraction.

8) Ouvrir le tube en poussant le couvercle rouge vers le haut.

9) Déposer l'échantillon de selles dans le tube d'extraction en utilisant la spatule :

- En cas de selles solides : un échantillon gros comme un pois
- En cas de selles liquides : 200 µl

10) Refermer le tube d'extraction en appuyant fortement sur le couvercle rouge.

11) Mélanger les selles avec la solution d'extraction en agitant fermement le tube, jusqu'à ce que l'échantillon se dissolve.

12) Laisser reposer le tube d'extraction pendant suffisamment de temps pour permettre aux grosses particules de tomber au fond du tube. Une autre possibilité serait de centrifuger l'échantillon une minute à 500-1000 TPM.

9. Exécution du test

6) Amener tous les réactifs à température ambiante (15-30°C).

7) Ouvrir l'emballage plastique de la cassette en le déchirant l'ouverture facile et sortir la cassette.

8) Ouvrir le tube d'extraction en poussant le couvercle rouge vers le haut et introduire la pipette à usage unique dans le tube. Remplir la pipette à usage unique avec la solution.

9) À l'aide de la pipette à usage unique, déposer 6 gouttes (200 µl) de la solution extraite dans

chaque puits  pour TOX-A et TOX-B.

10) Lire le résultat dans les 15 minutes suivant le dépôt de l'échantillon de la cassette.

10. Interprétation des résultats

Négatif

Une seule ligne de couleur apparaît dans la zone de contrôle (avant TOX-A ou TOX B), aucune ligne n'apparaît dans la zone de test (après les puits).

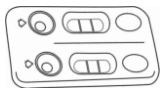


Négatif TOX-A

Négatif TOX-B

Positif

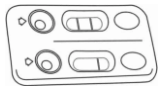
Une ligne de couleur apparaît dans la zone de contrôle (avant TOX-A ou TOX B). En outre, une autre ligne bien nette (!) apparaît dans la zone de test (après le puits).



Positif TOX-A

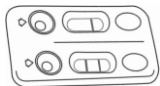


Positif TOX-B



Positif TOX-A

Négatif TOX-B



Négatif TOX-A

Positif TOX-B

Non-valide

Lorsqu'aucune ligne nette n'apparaît dans la zone de contrôle (avant TOX-A ou TOX B), le test est non-valide. Recommencer le test.



11. Contrôle qualité

Le test comporte un contrôle de procédé interne. Une ligne de couleur apparaissant dans la zone de contrôle indique que le test a été réalisé correctement. Cependant, le fond peut légèrement tourner au rouge lors du test, en fonction de la couleur de l'échantillon de selles. Ceci est acceptable tant que cela n'empêche pas l'interprétation des résultats.

12. Limites du test

- Le test NADAL[®] Clostridium difficile Toxine A&B a été spécialement conçu pour la détection des antigènes de la toxine A ou de la toxine B de *Cl. difficile* dans les selles humaines.
- Comme pour tout procédé de diagnostic *in vitro*, le médecin doit confirmer le résultat de test en combinaison avec d'autres méthodes cliniques.
- Un résultat négatif n'exclut pas automatiquement une infection aux toxines de *Cl. difficile*. Un tel résultat peut être dû à une digestion protéolytique des toxines à cause d'une mauvaise conservation de l'échantillon. S'il y a une suspicion fondée d'une infection, un autre échantillon de selles doit être contrôlé.
- Un résultat positif n'exclut pas la présence d'autres agents pathogènes.
- Dans quelques cas, des résultats faussement positifs peuvent se présenter lorsque les selles contiennent une quantité significative de sang.
- La coloration des lignes de test et de contrôle peuvent changer en fonction de l'aspect des selles. Par exemple des lignes de couleur vert foncé (au lieu de rose) ont été constatées lorsque des selles verdâtres ou vert foncé ont été testées. Cette coloration des selles intervient lorsqu'une carence en fer est traitée avec du fumarate ferreux. Le résultat du test doit être interprété comme d'habitude, c'est-à-dire deux lignes pour un résultat positif et une ligne pour un résultat négatif.

13. Caractéristiques de performance du test

Toxine A de *Cl. difficile*

Sensibilité analytique

La performance du test NADAL[®] Clostridium difficile Toxine A&B a été contrôlée en utilisant un spectre de solutions diluées. Ce faisant, un antigène pur de toxine A disponible dans le commerce a été utilisé.

Le test NADAL[®] Clostridium difficile Toxine A&B est capable de détecter la toxine A avec une concentration de 4 ng/ml.

Sensibilité et spécificité diagnostiques

Une étude a été réalisée avec 63 selles, comparant le test NADAL[®] Clostridium difficile Toxine A&B avec une méthode de cytotoxicité et de culture cellulaire.

Rassemblement des résultats :

		NADAL [®] Clostridium difficile Toxine A&B		
		+	-	Total
Cytotoxicité	+	13	2	15
	-	4	44	48
Total		17	46	63

Tous les échantillons ont présenté les mêmes résultats avec la méthode de cytotoxicité et de culture cellulaire.

À partir du tableau ci-dessous, on peut voir que la sensibilité du test NADAL[®] Clostridium difficile Toxine A&B est de 86,7% (13/15) par rapport à la méthode de cytotoxicité et la spécificité est de 91,7% par rapport à la méthode de cytotoxicité.

Réactions croisées

Le test NADAL[®] Clostridium difficile Toxine A&B a montré sans exception un résultat négatif jusqu'à 500 ng/ml de toxine B.

Toxine B de *Cl. difficile*

Sensibilité analytique

La performance du test NADAL[®] Clostridium difficile Toxine A&B a été contrôlée en utilisant un spectre de solutions diluées. Ce faisant, un antigène pur de toxine B disponible dans le commerce a été utilisé.

Le test NADAL[®] Clostridium difficile Toxine A&B est capable de détecter la toxine B avec une concentration de 5 ng/ml.

Spécificité

Un antigène de toxine A de *Cl. difficile* a été utilisé pour déterminer la spécificité du test. Le test NADAL[®] Clostridium difficile Toxine A&B a montré sans exception un résultat négatif jusqu'à 500 ng/ml de toxine A.

14. Références

- Lierly, D. M., H.C. Krivan, and T.D. Wilkins. 1988. Clostridium difficile: Its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. 1:1-18
- Mulligan, M.E., L.R. Peterson, R.Y.Y. Kwok, C.R. Clabots, and D.N. Gerding. 1988. Immunoblots and plasmid fingerprints compared with serotyping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing Clostridium difficile. J. Clin. Microbiol. 26:41-31
- Gilligan, P.H., L.R. McCarthy, and V.M. Genta. 1981. Relative frequency of Clostridium difficile in patients with diarrheal disease. J. Clin. Microbiol. 26:41-31
- George, W.L. 1989. Antimicrobial agent-associated diarrhea and colitis, p661-678. In S.M: Finegold and W.L. George (ed.), Anaerobic infections in humans. Academic Press, Inc. New York.
- Sullivan, N.M., Pellet S., and T.D. Wilkins. 1982. Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 35:1032-1040
- Lyerly, D.M., D.E. Lockwood, S.H. Richardson, and T.D. Wilkins. 1982. Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 35:1147-1150

Rév. : 2011-03-14 YF

1. Uso previsto

El NADAL[®] Clostridium Difficile Toxinas A y B es una prueba de diagnóstico rápido inmunocromatográfico para la detección cualitativa del antígeno de Clostridium difficile, toxina A y toxina B, en heces humanas.

2. Introducción y/o significado clínico

Clostridium Difficile es una causa importante de diarrea asociada a antibióticos y colitis pseudomembranosa. Actualmente es uno de los patógenos más frecuentemente detectados y una causa importante de infecciones nosocomiales en los hospitales y hogares de ancianos.

El organismo se ha aislado de diversos hábitats naturales, incluidos los suelos, heno, arena, estiércol de varios mamíferos grandes (vacas, burros y caballos), y de perros, gatos, roedores y heces humanas). C.difficile produce por lo menos tres factores de virulencia potencial, de los que se cree que la toxina A y toxina B son los más importantes en la patogénesis de las enfermedades asociadas al C.difficile.

La toxina A es una enterotoxina que interfiere con el citoesqueleto de las células epiteliales intestinales, haciendo que no funcionen, mientras que la toxina B es una citotoxina que induce un fuerte efecto citopático en cultivos celulares de tejidos lineales.

Dado que no todas las cepas de Clostridium difficile producen toxinas y aprox. 2% de los adultos sanos, así como hasta un 50% de los niños menores de 2 años pueden ser colonizados por Clostridium difficile, la detección de las toxinas (la toxina A y toxina B) en muestras de heces de pacientes con diarrea es más importante que el cultivo de la bacteria.

3. Principio del test

La prueba consta de una caja de plástico con dos membranas diferentes para la detección separada de C.difficile toxina A y de la toxina B. Hay anticuerpos monoclonales de oro coloreados contra la toxina A y B en el extremo de cada membrana.

Una vez recogida la muestra de heces se disuelve en un tubo que contiene la solución de extracción, y se añaden 6 gotas de esta solución a cada pocillo del dispositivo de reacción.

Durante el flujo de la muestra a través de la membrana, se une el conjugado coloreado de anticuerpos aplicado sobre la membrana al antígeno de la toxina A o toxina B (cuando están presentes en la muestra) formando un complejo antígeno- anticuerpo.

Este complejo se une a los anticuerpos policlonales anti-toxina A o anti-toxina B en la zona de reacción, produciendo una línea de color rosa-rojo. En ausencia de la toxina A o toxina B, no aparecerá ninguna línea en la zona de reacción. La mezcla de reacción continúa fluyendo a través del dispositivo absorbente, más allá de la zona de reacción positiva hasta la zona de control.

El conjugado sin consolidar se une a los reactivos ahí presentes dando lugar a una línea de color de rosa que demuestra que el reactivo está funcionando correctamente.

4. Reactivos y materiales provistos

Cada kit contiene todo lo necesario para desarrollar 10 tests.

- 10 test NADAL[®] CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINAS A&B
- 10 pipetas desechables
- 10 tubos de extracción con 2ml con de solución de extracción
- 10 aplicadores de muestras
- Un prospecto

5. Material adicional necesario

- Cronómetro
- Colector de muestras

6. Almacenamiento y conservación

- Todos los componentes del kit deben ser almacenados a temperatura ambiente (entre 4 ° C y +30 ° C) en el sobre sellado.
- No congele el kit de prueba.
- El kit es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.

7. Advertencias y precauciones

1. Esta prueba está diseñada para uso de diagnóstico in vitro y uso profesional. Lea atentamente el prospecto de instrucciones antes de usar esta prueba.
2. No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.
3. No usar el test si el envoltorio de protección está dañado.
4. Todos los reactivos y materiales que entren en contacto con potenciales especímenes infecciosos deben ser tratados con desinfectantes apropiados o autoclave a 121 ° C durante al menos una hora.
5. Usar ropa protectora, como batas de laboratorio y guantes desechables durante el análisis de las muestras.
6. No comer, beber o fumar en el área donde se encuentran las muestras y los reactivos del kit.
7. Evitar cualquier contacto entre las manos y los ojos o la nariz durante la recogida de muestras y pruebas.

8. Toma de muestras y preparación

1) Información preliminar

Se deben tomar las muestras de heces lo más pronto posible tras la aparición de los síntomas.

Las muestras diluidas pueden conservarse entre 2°C y 8°C durante 3 días sin interferir en el funcionamiento del ensayo.

Para el almacenamiento a largo plazo de las muestras no diluidas, se recomienda el almacenamiento a -20°C o más frío. La congelación y descongelación repetida de las muestras no es recomendable ya que puede causar resultados erróneos.

¡Atención!

No recoja las muestras en contenedores que tengan conservantes, suero de animales o detergentes, ya que pueden interferir el examen.

2) Procedimiento

a) Etiquete el tubo de plástico que contiene la solución de extracción con el nombre del paciente y/o el número de control.

b) Abra el tubo y utilizando el aplicador de muestra transfiera a él una muestra de materia fecal:

- del volumen de un guisante aproximadamente, en el caso de heces sólidas
- 200 µl en caso de heces líquidas.

c) Cierre la tapa y mezcle la muestra de heces y el diluyente agitando bien hasta que la muestra se disuelva.

d) Deje el tubo de pie el tiempo suficiente para que las partículas grandes se depositen en el fondo del tubo. Alternativamente, puede centrifugar el tubo a 500-1.000 RPM durante 1 minuto.

9. Procedimiento del test

a) Lleve los reactivos a temperatura ambiente (15-30°C).

b) Saque el cassette del sobre rasgando a lo largo de la línea.

c) Abrir el tubo de plástico que contiene la muestra extraída, introduzca la pipeta desechable y llénela con la solución.

d) Con la pipeta de plástico, añada 6 gotas (200 microlitros) de la solución extraída en cada uno de los pozos de la muestra.

e) Lea los resultados del examen 15 minutos después de la adición de la muestra al dispositivo.

10. Interpretación de resultados

NEGATIVO: aparece una línea de color en la zona marcada con la letra C (línea de control), pero ninguna línea en la zona de test (T)



POSITIVO: Además de la línea de control, también aparecen una línea de color en la zona de test, indicando la toxina que da positivo.



NO VALIDO: Si no hay una línea de distintos colores visibles en la zona de control, la prueba no es concluyente. Repita la prueba.



11. Características de rendimiento

1. Clostridium difficile TOXINA A

a) Sensibilidad analítica

La realización de la prueba se hizo utilizando una gama de soluciones diluidas preparadas a partir de un antígeno depurado de la toxina A disponible comercialmente. La prueba es capaz de detectar una concentración de la toxina A de 4 ng/ml.

b) Diagnóstico de sensibilidad y especificidad

Se realizó un estudio con 63 muestras de heces, en el que se comparó el test NADAL[®] Clostridium difficile de las toxinas A y B con la citotoxicidad y los métodos de cultivo celular.

Los resultados se muestran en la tabla:

		NADAL [®] CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINAS A&B		Total
		+	-	
Cytotoxicidad	+	13	2	15
	-	4	44	48
Total		17	46	63

Todas las muestras mostraron idénticos resultados con la citotoxicidad y los métodos de cultivo celular.

En el cuadro anterior, la sensibilidad de NADAL[®] CLOSTRIDIUM DIFFICILE toxinas A y prueba B es 86,7% (13/15), en comparación con el método de citotoxicidad y una especificidad del 91,7% (44/48), en comparación con el método de citotoxicidad.

c) Reacciones cruzadas

El test NADAL[®] Clostridium difficile toxinas A y B mostró un resultado negativo hasta 500 ng/ml de Toxina B.

2. Clostridium difficile TOXINA B

a) Sensibilidad analítica

La sensibilidad de la prueba se ha evaluado utilizando una gama de soluciones diluidas preparadas a partir de un antígeno purificado de Toxina B de C. Difficile disponible en el mercado. La prueba es capaz de detectar una concentración de la toxina B de 5 ng/ml.

b) Especificidad

Se utilizó un antígeno purificado de C.Difficile de la Toxina B para determinar la especificidad de la prueba.

c) Reacciones cruzadas

El test NADAL[®] Clostridium difficile toxinas A y B mostró un resultado negativo hasta 500 ng/ml de Toxina A.

12. Limitaciones

1. El NADAL[®] Clostridium difficile para las toxinas A y B está diseñado específicamente para detectar el antígeno de la toxina A o toxina B en las muestras de heces.
2. Como en cualquier procedimiento de diagnóstico in vitro, el médico debe confirmar los resultados con otros métodos clínicos.
3. Un resultado negativo no excluye una infección general de C.difficile. Puede ser causado por la digestión proteolítica de las toxinas en el almacenaje inadecuado de la muestra. Si existe una sospecha razonable de la infección, otra muestra de heces debe ser investigada.
4. Un resultado positivo no excluye la presencia de otros patógenos.
5. La presencia de sangre en las muestras de heces en cantidades significativas pueden generar falsos resultados positivos en casos limitados.
6. Las pruebas de colores y líneas de control pueden cambiar un poco en función del aspecto de la muestra de heces. Por ejemplo las líneas de color verde oscuro (en vez de rayas rosas) han sido reportados analizando muestras de heces de color verdoso o negruzco. Esta coloración aparece en heces en caso de tratamiento de la deficiencia de hierro con fumarato ferroso. El resultado de la prueba debe ser interpretada como de costumbre, es decir, dos líneas para un resultado positivo y una línea para un resultado negativo.

13. Referencias

1. Lierly, D.M, H.C. Krivan, and T.D. Wilkins. 1988. Clostridium difficile : its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. 1:1-18.
2. Mulligan, M.E., L.R. Peterson, R.Y.Y. Kwok, C.R. Clabots, and D.N. Gerding. 1988. Immunoblots and plasmid fingerprints compared with serotyping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing Clostridium difficile. J. Clin. Microbiol. 26 : 41-31.

3. Gilligan, P.H., L.R. McCarthy, and V.M. Genta. 1981. Relative frequency of Clostridium difficile in patients with diarrheal disease. J. Clin. Microbiol. 14 : 26-31.
4. George, W.L. 1989. Antimicrobial agent-associated diarrhea and colitis, p661-678. In S.M. Finegold and W.L. George (ed.), Anaerobic infections in humans. Academic Press, Inc. New York.
5. Sullivan, N.M., Pellet S., and T.D. Wilkins. 1982. Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 35 : 1032-1040.
6. Lierly, D.M., D.E. Lockwood, S.H. Richardson, and T.D. Wilkins. 1982. Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 35 : 1147-1150.

REF : 2012-09-20 IA

1. Uso Previsto

Il test NADAL[®] Clostridium difficile Tossine A&B è un test rapido immunocromatografico a flusso laterale per il rilevamento qualitativo dell'antigene del *Clostridium difficile* Tossina A e Tossina B nelle feci umane.

2. Introduzione e/o Significato clinico

Clostridium difficile è la principale causa di diarrea correlata ad antibiotici e a colite pseudomembranosa (1). Attualmente è uno dei più comuni patogeni rilevati e una delle più importanti cause di infezioni nosocomiali negli ospedali e nelle case di cura (2, 3).

L'organismo è stato isolato in diversi habitat naturali, come terriccio, fieno, sabbia, concime, in diversi grandi mammiferi (bovini, asini, cavalli) ed in cani, gatti, roditori e feci umane (4). *C. difficile* genera almeno tre potenziali fattori virulenti, di cui la Tossina A e la Tossina B sono considerati i più importanti nella patogenesi delle malattie associate a *C. difficile* (5).

La Tossina A è una enterotossina che sembra interferire con il citoscheletro delle cellule dell'epitelio intestinale, rendendole inattive, mentre la Tossina B è una citotossina che causa forti effetti citopatici nelle linee cellulari del tessuto di colture (6).

Poiché non tutti i tipi *Clostridium difficile* generano tossine e circa il 2% degli adulti in salute e fino al 50% dei bambini minori di 2 anni possono essere colonizzati dal *Clostridium difficile*, il rilevamento delle tossine (Tossina A e Tossina B) nei campioni di feci di pazienti con diarrea risulta più significativo rispetto alle colture batteriche.

3. Principio del Test

Il dispositivo del test consiste in una custodia di plastica contenente due differenti strisce per il rilevamento di *C. difficile* Tossina A o *C. difficile* Tossina B. Un coniugato anticorpo monoclonale oro colloidale colorato anti *C. difficile* Tossina A o *C. difficile* Tossina B è collocato all'estremità sinistra della membrana.

Dopo essere stato raccolto in un tubetto contenente una soluzione di estrazione, il campione di feci si scioglie ed alcune gocce di questo estratto vengono aggiunte in ciascuno dei pozzetti del dispositivo reattivo.

Appena il campione del test scorre lungo il dispositivo assorbente, il coniugato marcato anticorpo-colorante si lega all'antigene della Tossina A o della Tossina B (qualora presente nel campione), formando un complesso anticorpo antigene.

Tale complesso coniuga l'anticorpo policlonale anti-Tossina A o Tossina B nella zona reattiva positiva, generando una linea rosa.

In assenza di Tossina A o Tossina B, nella zona reattiva positiva non apparirà nessuna linea. Il composto reattivo scorre lungo il dispositivo assorbente, oltre la zona reattiva positiva verso la zona di controllo.

Il coniugato non bloccato si lega con il reagente nella zona di controllo, generando una linea di colore rosa, a dimostrazione del corretto funzionamento dei reagenti.

4. Reagenti e materiali forniti

Ogni kit del test NADAL[®] Clostridium difficile Tossine A&B Testkit contiene quanto necessario per realizzare 10 test:

- 10 cassette Test NADAL[®] Clostridium difficile Tossine A&B
- 10 Contagocce monouso di plastica
- 10 tubi di estrazione (con 2 mL di soluzione di estrazione)
- 10 applicatori di campione
- 1 libretto d'istruzioni

5. Ulteriori materiali richiesti

- Cronometro
- Collettore di feci

6. Conservazione e stabilità

Tutti i componenti del kit NADAL[®] Clostridium difficile Tossine A&B Test dovrebbero essere conservati nella confezione sigillata a temperatura ambiente (tra i +2°C ed i +30°C). Non congelare il kit del test. Il kit NADAL[®] Clostridium difficile Tossine A&B Test kit è valido sino alla data di scadenza riportata sull'etichetta della confezione.

7. Avvertenze e precauzioni

- Il test è progettato solo per un uso diagnostico in vitro e per un utilizzo professionale.
- Leggere attentamente il libretto d'istruzioni prima di usare il test.
- Non utilizzare oltre la data di scadenza riportata sull'etichetta della confezione.
- Non utilizzare test con l'involucro protettivo danneggiato.
- Tutti i reagenti ed i materiali venuti a contatto con campioni potenzialmente infetti devono essere trattati con disinfettanti appropriati o sterilizzati a 121°C per almeno un'ora.
- Utilizzare abiti protettivi come camici da laboratorio o guanti usa e getta durante l'utilizzo dei campioni.
- Non mangiare, bere o fumare nell'area in cui i campioni ed il kit di reagenti vengono utilizzati.
- Evitare qualsiasi contatto tra le mani, gli occhi o il naso durante la raccolta del campione e l'esecuzione del test

8. Raccolta e preparazione del campione

Osservazioni preliminari su raccolta e conservazione del campione

Il campione di feci deve essere raccolto il prima possibile dopo il manifestarsi dei sintomi.

I campioni diluiti possono essere conservati da +2°C a +8°C per 3 giorni senza che ciò interferisca sulle performances del saggio.

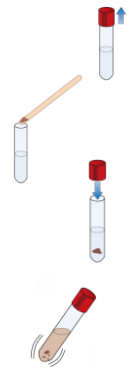
Per la conservazione a lungo termine di campioni non diluiti, si raccomanda di conservare a -20°C o a temperatura inferiore. Il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni non è consigliato e può causare risultati errati.

Attenzione!

Non raccogliere il campione in contenitori in cui vi siano elementi, conservanti, siero animale o detergenti, qualora questi possano interferire con il test.

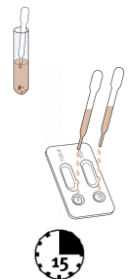
Procedimento di raccolta del campione

- 1) Contrassegnare il tubo contenente la soluzione di estrazione con il nome del paziente o il numero di controllo.
- 2) Aprire il tubo di estrazione.
- 3) Usando l'applicatore del campione, trasferire il campione di feci nel tubo di estrazione:
 - Volume di un pisello, in caso di feci solide
 - 200 µl in caso di feci liquide
- 4) Chiudere il tubo di estrazione stringendo il tappo rosso.
- 5) Mescolare il campione di feci ed il diluente mescolando bene fino a che il campione non si dissolve.
- 6) Tenere il tubo in verticale sino a che le particelle più voluminose non si siano sciolte. Oppure, centrifugare il tubo a 500-1.000 RPM per 1 minuti.



9. Procedura del Test

- 1) Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (15-30°C).
- 2) Estrarre il dispositivo del test dalla confezione aprendola lungo l'apertura.
- 3) Aprire la provetta contenente il campione estratto.
- 4) Usando la pipetta, aggiungere 6 gocce (200 µl) di soluzione di estrazione in ogni pozzetto del campione per TOX-A e TOX-B.
- 5) Leggere i risultati del test 15 minuti dopo l'aggiunta del campione nel test.



10. Interpretazione dei risultati

Negativo

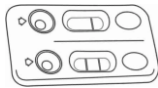
Solo una linea colorata appare nella zona di controllo
Nessuna linea è visibile nella zona test



Positivo

In aggiunta alla linea di controllo, una linea chiaramente visibile appare nella zona test



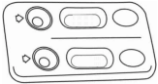


TOX-A negativo

TOX-B positivo

Non valido

Se non vi è alcuna distinta linea colorata nella zona di controllo, il test non è valido. Ripetere il test.



11. Controllo di qualità

Uno sfondo chiaro nella finestra di osservazione è considerato un controllo negativo interno. In ogni caso, quando il campione di feci viene testato, lo sfondo può apparire lievemente rossastro a causa del colore originale del campione. Questo è accettabile fino a che non interferisce con l'interpretazione dei risultati del test. Il test non è valido se lo sfondo non è chiaro ed oscura la lettura del risultato.

12. Limitazioni

- NADAL® Clostridium difficile Tossine A&B Test è specificamente progettato per rilevare l'antigene di Tossina A o Tossina B nelle feci.
- Come per ogni procedura diagnostica *in vitro*, il medico dovrebbe confermare il risultato del test con altri metodi di analisi.
- Un risultato negativo non esclude in generale una infezione da *C.difficile*. Può essere causato dalla digestione proteolitica delle tossine, dovuta a una conservazione impropria del campione. Qualora esista un ragionevole sospetto di infezione, un altro campione di feci dovrebbe essere esaminato.
- Un risultato positivo non esclude la presenza di altri agenti patogeni.
- La presenza del sangue nei campioni di feci in quantità significative potrebbe portare a risultati falso positivi in casi limitati.
- I colori delle linee di test e di controllo potrebbero leggermente variare a seconda dell'aspetto del campione di feci. Per esempio linee verdi scure (invece che linee rosa) sono state osservate testando campioni di feci verdastri o nerastri. Questa colorazione delle feci può apparire in caso trattamento con ferroso fumarato della carenza di ferro. Il risultato del test deve essere interpretato al solito, ovvero due linee per un risultato positivo ed una per un risultato negativo.

13. Caratteristiche delle performances

C.difficile Tossina A

Sensibilità analitica

La performance di NADAL® Clostridium difficile Tossine A&B Test è stata testata usando una serie di soluzione diluite preparate con un antigene puato di Tssina A disponibile in commercio. Il test NADAL® Clostridium difficile Tossine A&B Test è capace di rilevare una concentrazione di 4 ng/mL.

Sensibilità e specificità diagnostica

È stato realizzato uno studio su 63 campioni di feci, usando il test NADAL® Clostridium difficile Tossine A&B Test test e mettendolo a confronto col metodo citotossico e con il metodo delle colture cellulari.

I risultati sono riassunti nella tavola 1:

		NADAL® Clostridium difficile Tossine A&B		Total
		+	-	
Citotossicità	+	13	2	15
	-	4	44	48
Totale		17	46	63

Tutti i campioni hanno mostrato gli stessi risultati usando il metodo citotossico e quello delle colture cellulari.

Dalla tavola soprastante, la sensibilità di NADAL® Clostridium difficile Tossine A&B Test è del 86.7% (13/15), comparatodo al metodo della citotossicità, mentre la specificità è del 91.7% (44/48), comparata al metodo della citotossicità.

Reazione incrociata

NADAL® Clostridium difficile Tossine A&B Test ha mostrato risultati significativamente negativi fino a 500 ng/mL Tossina B.

C.difficile Tossina B

Sensibilità Analitica

La sensibilità di NADAL® Clostridium difficile Tossine A&B Test è stata valutata usando una serie di soluzioni diluite preparate con un antigene purificato di C.D. Tossina B disponibile in commercio. A queste condizioni,

il limite di detenzione di NADAL® Clostridium difficile Tossine A&B Test è stato rilevato a 5 ng/mL.

Specificità

Un antigene purificato di *C. difficile* Tossina A è stato usato per determinare la specificità del test. NADAL® Clostridium difficile Tossine A&B Test ha mostrato risultati consistentemente negativi fino a 500 ng/mL Tossina A.

14. Bibliografia

- 7) Lierly, D. M., H.C. Krivan, and T.D. Wilkins. 1988. Clostridium difficile: Its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. 1:1-18
- 8) Mulligan, M.E., L.R. Peterson, R.Y.Y. Kwok, C.R. Clabots, and D.N. Gerding. 1988. Immunoblots and plasmid fingerprints compared with serotyping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing Clostridium difficile. J. Clin. Microbiol. 26:41-31
- 9) Gilligan, P.H., L.R. McCarthy, and V.M. Genta. 1981. Relative frequency of Clostridium difficile in patients with diarrheal disease. J. Clin. Microbiol. 26:41-31
- 10) George, W.L. 1989. Antimicrobial agent-associated diarrhea and colitis, p661-678. In S:M: Finegold and W.L. George (ed.), Anaerobic infections in humans. Academic Press, Inc. New York.
- 11) Sullivan, N.M., Pellet S., and T.D. Wilkins. 1982. Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 35:1032-1040
- 12) Lierly, D.M., D.E. Lockwood, S.H. Richardson, and T.D. Wilkins. 1982. Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 35:1147-1150

Ref.: 2010-09-03 LB

1. Zastosowanie

Test NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B jest szybkim testem immunochromatograficznym do jakościowego wykrywania antygenu Clostridium difficile Toksyn A i B w ludzkim stolcu.

2. Wprowadzenie i / lub znaczenie diagnostyczne

Clostridium difficile jest główną przyczyną biegunki związanej z zażywaniem antybiotyków oraz rzekomobłoniastego zapalenia jelita. Jest jednym z najczęściej wykrywanych patogenów oraz przyczyną zakażeń w szpitalach i domach opieki.

Clostridium difficile został wyizolowany ze zróżnicowanych naturalnych siedlisk wliczając glebę, siano, piasek, obornik różnych dużych ssaków (krów, osłów, koni) a także fekalia psów, kotów, gryzoni i ludzi. Cl.difficile produkuje co najmniej trzy potencjalnie czynniki wirulencyjne, z których toksyny A i B są uważane za najważniejsze w patogenie chorób wywołanych przez Cl.difficile.

Toksyna A jest enterotoksyną, która wpływa na cytoskielet komórek nabłonkowych jelita i je dezaktywuje podczas gdy Toksyna B jest cytotoksyną, która powoduje silne efekty cytopatyczne w kulturach dzielących się komórek. Ponieważ nie wszystkie szczepy Cl. difficile produkują toksyny około 2% zdrowych dorosłych oraz 50% dzieci młodszych niż 2 lata może być skolonizowanych przez Cl. difficile, wykrycie toksyn A i B w próbkach stolca u pacjentów z biegunką ma większe znaczenie niż hodowla bakterii.

3. Zasady działania testu

Test NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B składa się z plastikowego pojemnika zawierającego dwie różne szpatułki z różnymi membranami do oddzielnego wykrywania Cl. difficile Toksyn A lub Cl. difficile Toksyn B. Kolorowe monoklonalne antyciała koloidalnego koniugatu złota przeciw Cl. difficile Toksyn A i Toksyn B znajduje się na lewym końcu membrany.

Po pobraniu próbki do tuby z rozcieńczalnikiem, próbka fekalii zostaje rozpuszczona. Do każdej ze studzienek należy dodać kilka kropeł roztworu. Kiedy próbka przepływa przez chłonne urządzenie, oznaczone antyciała zabarwionego koniugatu wiąże się z antygenem toksyny A lub B (jeśli jest on obecny w próbce) tworząc Komplex Antyciała-Antygen. Ten kompleks wiąże się z poliklonalnym antyciałem anty - Toksynie A lub B w polu reakcji pozytywnej tworząc linie zabarwioną na różowo. W przypadku gdy Toksyny A i B nie są obecne w polu reakcji pozytywnej nie pojawia się żadna linia. Mikstura reakcji ciągle przepływa przez chłonne urządzenie, kolejno przez pole reakcji pozytywnej oraz pole kontroli. Nie związany koniugat wiąże się z reagentem w polu kontroli tworząc linie zabarwioną na różowo co pokazuje, że reagenty funkcjonują prawidłowo.

4. Materiały zawarte w zestawie

Każdy zestaw testowy NADAL[®] Clostridium difficile Toksyny A i B zawiera materiały potrzebne do przeprowadzenia 10 testów.

- 10 testów kasetowych NADAL[®] Clostridium difficile Toksyny A i B
- 10 jednorazowych pipet
- 10 pojemników ekstrakcyjnych (wypełnionych 2 mL roztworu ekstrakcyjnego)
- 10 aplikatorów
- 1 instrukcja obsługi

5. Potrzebne materiały, niezawarte w zestawie

- Stoper
- Przyrząd do pobierania kału

6. Przechowywanie i ważność odczynników

Wszystkie komponenty zestawu NADAL[®] Clostridium difficile Toksyny A i B powinny być przechowywane w szczelnie zamkniętym opakowaniu w temperaturze pokojowej (od +2°C do +30°C) do daty ważności umieszczonej na opakowaniu. Nie zamrażać zestawu testowego.

7. Środki ostrożności

- Test jest przeznaczony tylko do diagnostyki in vitro oraz profesjonalnego użytku.
- Przed użyciem dokładnie zapoznać się z instrukcją obsługi.
- Nie stosować po upływie terminu ważności.
- Nie stosować jeśli opakowanie ochronne jest uszkodzone.
- Wszystkie reagenty i materiały, które były w kontakcie z potencjalnie zainfekowanymi próbkami muszą być zdezynfekowane lub wysterylizowane w autoklawie w temperaturze 121°C co najmniej przez jedną godzinę.
- Podczas badania używać ubrań ochronnych takich jak fartuchy ochronne oraz jednorazowe rękawiczki.
- Nie jeść, nie pić ani nie palić w miejscu przeprowadzania testu.
- Unikać kontaktu rąk z oczami i nosem podczas pobierania próbki oraz przeprowadzania badania.

8. Pobieranie, przygotowywanie próbek

Wstępne informacje o przechowywaniu i przygotowywaniu próbek.

Próbki kału powinny być pobrane tak szybko jak to możliwe zaraz po wystąpieniu pierwszych symptomów.




Rozcieńczone próbki mogą być przechowywane w lodówce w temperaturze od +2°C do +8°C przez 3 dni co nie będzie miało wpływu na wyniki badania.

W przypadku dłuższego przechowywania nierozcieńczonych próbek zaleca się przechowywanie ich w temperaturze -20°C lub niższej. Nie zaleca się wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek gdyż może to powodować fałszywe wyniki.




Uwaga!

Nie pobierać próbek do pojemników zawierających media, konserwaty, surowicę zwierzęcą lub detergenty ponieważ mogą one zakłócać pracę testu.

Procedura pobierania próbek

- 1) Plastikowy pojemnik zawierający roztwór ekstrakcyjny oznaczyć imieniem pacjenta lub numerem kontrolnym pacjenta.
- 2) Otworzyć tubę ekstrakcyjną. 
- 3) Za pomocą aplikatora przenieść próbkę kału do tuby ekstrakcyjnej.
 - Przy stałym stolcu próbka powinna być wielkości grochu.
 - Prz stolcu płynnym próbka powinna wynosić 200 µl.
- 4) Tubę ekstrakcyjną należy zamknąć poprzez nałożenie czerwonej zakrętki.
- 5) Wymieszać próbkę kału z rozcieńczalnikiem poprzez silne wstrząśnięcie aż do rozpuszczenia próbki.
- 6) Tubę pozostawić na tak długo aż duże cząsteczki osadzą się na spodzie tuby. Alternatywnie odwirować tubę na 500-1.000 RPM na minutę. 

9. Procedura przeprowadzania testu

- 1) Wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (15-30°C).
- 2) Wyjąć test poprzez rozerwanie wzdłuż łączenia torebki.
- 3) Otworzyć pojemnik ekstrakcyjny poprzez pociągnięcie czerwonej zakrętki do góry i włożyć jednorazową pipetę do pojemnika. Napełnić pipetę roztworem. 
- 4) Używając plastikowej pipety dodać 6 kropeł (200 µl) roztworu ekstrakcyjnego do każdej ze studzienek testowych dla TOX-A i TOX-B. 
- 5) Odczytać wyniki testu po 15 minutach po podaniu próbki. 

10. Interpretacja wyników

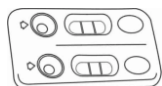
Negatywny

Kolorowa linia pojawia się tylko w polu kontrolnym. Brak linii w polu testowym.



Pozytywny

Oprócz linii w polu kontrolnym pojawia się również dobrze widoczna linia w polu testowym.



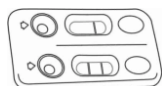
TOX-A pozytywny

TOX-B pozytywny



TOX-A pozytywny

TOX-B negatywny

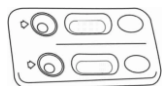


TOX-A negatywny

TOX-B pozytywny

Nieważny

Jeżeli w polu kontrolnym nie pojawia się żadna kolorowa linia test jest nieważny. Należy powtórzyć badanie.



11. Kontrola jakości

Test posiada funkcję kontroli wewnętrznej. Kolorowa linia pojawiająca się w polu kontrolnym wskazuje na prawidłowe wykonanie testu. Tło testu może lekko zabarwić się ze względu na kolor próbki. Jest to dopuszczalne jeśli nie zakłóca interpretacji wyników.

12. Ograniczenia testu

- Test NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B został zaprojektowany do wykrywania antygenów Toksyn A i B w próbkach kału.
- Tak jak przy przeprowadzaniu jakichkolwiek badań in vitro, lekarz powinien potwierdzić wyniki testu innymi badaniami klinicznymi.
- Negatywny wynik testu nie wyklucza zakażenia Cl.difficile. Wynik negatywny może być spowodowany proteolitycznym trawieniem toksyny wywołanym przez nieprawidłowe przechowywanie próbki. Jeżeli istnieje podejrzenie zakażenia należy przebadać inną próbkę kału.
- Wynik pozytywny nie wyklucza obecności innych patogenów.
- W niewielu przypadkach obecność znaczącej ilości krwi w kale może prowadzić do fałszywych wyników pozytywnych.
- Kolory linii testowych i kontrolnych mogą się różnić, jest to spowodowane kolorem próbki kału. Podczas badania próbek o ciemnozielonym kolorze, linie miały kolor ciemnozielony (zamiast różowego). Takie zabarwienie kału występuje podczas leczenia niedoboru żelaza lekami, które zawierają ferrous fumerate. W takich przypadkach wyniki testu powinny być odczytywane tak jak zwykle, np. dwie linie przy wyniku pozytywnym oraz jedna linia przy wyniku negatywnym

13. Charakterystyka testu

Cl.difficile Toksyny A

Czułość analityczna

Działanie testu NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B zostało sprawdzone za pomocą rozcieńczonych roztworów, wykorzystując przy tym dostępny komercyjnie oczyszczony antygen Toksyny A.

Test może wykryć koncentrację Toksyny A na poziomie 4 ng/mL.

Czułość i swoistość diagnostyczna

Badanie przeprowadzono na 63 próbkach kału, używając testu NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B porównując je z metodami cytotoksyn i kultury komórkowej.

Wyniki przedstawiono w tabeli nr 1.

		NADAL [®] Clostridium difficile Toxin A&B		Razem
		+	-	
Cytotoksyny	+	13	2	15
	-	4	44	48
Total		17	46	63

Przy badaniach metodami cytotoksyn il hodowli komórek wszystkie próbki miały identyczne wyniki.

Z powyższej tabeli wynika, że czułość testu NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B przy badaniach metodą cytotoksyn wynosi 86,7% (13/15), a swoistość wynosi 91,7% .

Rakcje krzyżowa

Test NADAL[®] Clostridium difficile Toksyny A&B wykazał konsekwentnie negatywne wyniki do 500 to ng/mL Toksyny B.

Cl.difficile Toxin B

Czułość analityczna

Czułość testu NADAL[®] Clostridium difficile Toxin A&B została przebadana za pomocą serii rozcieńczonych roztworów przygotowanych z dostępnego na rynku oczyszczonego antygeny Toksyny B.

Test może wykryć koncentrację Toksyny B na poziomie 5 ng/mL.











Swoistość











Oczyszczony antygen Cl.difficile Toksyny A został użyty do określenia swoistości testu.

Test NADAL[®] Clostridium difficile Toksyny A&B wykazał konsekwentnie negatywne wyniki do 500 to ng/mL Toksyny A.

14. Bibliografia

1. Lierly, D, M, H.C. Krivan, and T.D. Wilkins. 1988. Clostridium difficile: Its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. 1:1-18
2. Mulligan, M.E., L.R. Peterson, R.Y.Y. Kwok, C.R. Clabots, and D.N. Gerding. 1988. Immunoblots and plasmid fingerprints compared with serotyping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing Clostridium difficile. J. Clin. Microbiol. 26:41-31
3. Gilligan, P.H., L.R. McCarthy, and V.M. Genta. 1981. Relative frequency of Clostridium difficile in patients with diarrheal disease. J. Clin. Microbiol. 26:41-31
4. George, W.L. 1989. Antimicrobial agent-associated diarrhea and colitis, p661-678. In S:M: Finegold and W.L. George (ed.), Anaerobic infections in humans. Academic Press, Inc. New York.
5. Sullivan, N.M., Pellet S., and T.D. Wilkins. 1982. Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 35:1032-1040
6. Lyerly, D.M., D.E. Lockwood, S.H. Richardson, and T.D. Wilkins. 1982. Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. 35:1147-1150

Symbol	English	Deutsch	Français	Nederlands	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Gebruiksaanwijzing	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conform Europese richtlijnen	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	In vitro diagnostisch gebruik	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Catalogus nummer	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Lot nummer	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Geschikt voor <n> tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungs-temperatur	Température de conservation	Opslag temperatuur	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Houdbaarheids datum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	nal von minden GmbH, Carl-Peschken-Straße 9, 47441 Moers, Germany	nal von minden GmbH, Carl-Peschken-Straße 9, 47441 Moers, Germany	nal von minden GmbH, Carl-Peschken-Straße 9, 47441 Moers, Germany	nal von minden GmbH, Carl-Peschken-Straße 9, 47441 Moers, Germany	nal von minden GmbH, Carl-Peschken-Straße 9, 47441 Moers, Germany	nal von minden GmbH, Carl-Peschken-Straße 9, 47441 Moers, Germany
	Content	Inhalt	Conditionnement	Inhoud	Contenido	Contenuto

Symbol	Polski	Suomi	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Patrz: ulotka informacyjna	Katso käyttöohjeet	Consulte as instruções de utilização	Se brugsanvisning	Se bruksanvisningen	Εγχειρίδιο χρήστη
	Znak zgodności CE	CE-merkitty	Conformidade com as normas europeias	Europeaisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Tylko do użytku in-vitro	In vitro-diagnostiikka	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	In vitro diagnostik	in vitro διαγνωστικό
	Numer katalogowy	Luettelonumero	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalognummer	Αριθμός καταλόγου
	Numer serii	Eränumero	No do lote	Lot nummer	Batchnummer	Αριθμός Παρτίδος
	Wystarszające na "n" powtórzeń	Sisältää tarvikkeet "n" testiin		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura przechowywania	Säilytyslämpötila	Temperatura de conservação	Opbevarings-temperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Data ważności	Viimeinen käyttöpäivä	Prazo de validade	Udløbsdato	Utgångsdatum	Ημερομηνία λήξης
	nal von minden GmbH, Carl-Peschken-Straße 9, 47441 Moers, Germany	nal von minden GmbH, Carl-Peschken-Straße 9, 47441 Moers, Germany	nal von minden GmbH, Carl-Peschken-Straße 9, 47441 Moers, Germany	nal von minden GmbH, Carl-Peschken-Straße 9, 47441 Moers, Germany	nal von minden GmbH, Carl-Peschken-Straße 9, 47441 Moers, Germany	nal von minden GmbH, Carl-Peschken-Straße 9, 47441 Moers, Germany
	Zawartość	Sisältö	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο



NOTES:



NOTES:



NOTES:



CONTACT:

www.nal-vonminden.com
info@nal-vonminden.de

Team Germany:

Regensburg

Tel: +49 (941) 29010-0
Fax: +49 (941) 29010-50

Moers

Tel: +49 (2841) 99820-0
Fax: +49 (2841) 99820-1

Team Austria:

Tel: +49 (0) 941 29010-38
Free Tel: 0800 291 565
Fax: +49 (0) 290 10 50
Free Fax: 0800 298 197

Team UK & Ireland:

Tel: +49 (0) 941 29010-35
Free Tel –UK: 0808 234 1237
Free Tel – IRE: 1800 555 080
Fax: +49 (0) 941 29010-50
Free Fax:

Team Spain:

Tel: +49 (0) 941 280 963 80
Free Tel: 900 938 315
Fax: +49 (0) 941 29010-50
Free Fax: 900 984 992

Team France:

France Tel: 0800 915 240
France Fax: 0800 564 720
Swiss Tel: 0800 564 720
Swiss Fax: 0800 837 476
Belgium Tel: 0800 718 82
Belgium Fax: 0800 747 07
Lux. Tel: 800 211 16
Lux. Fax: 800 261 79

Team Poland:

Tel: +49 (0) 941 29010-20
Free Tel: 00 800 491 15 95
Fax: +49 (0) 941 29010-50
Free Fax: 00 800 491 15 94

Team Italy:

Tel: +49 (0) 941 29010-34
Fax: +49 (0) 941 29010-50

Team Netherlands:

Tel: +31 (0) 30 75 600
Free Tel: 0800 0222 890
Fax: +31 (0) 70 30 30 775
Free Fax: 0800 024 9519

ELISA - Sales Lab Team:

Tel: +49 (941) 29010-40
Fax: +49 (941) 29010-50



nal von minden GmbH
Carl-Zeiss-Straße 12
47445 Moers
Germany

www.nal-vonminden.de