

# RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B

Réf. : C0801



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Allemagne

Téléphone : +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax : +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B est un dosage immunoenzymatique permettant la détermination qualitative des toxines A et B de *Clostridium difficile* dans les échantillons de selles humaines et dans les cultures provenant de souches de *Clostridium difficile* produisant des toxines cultivées dans des échantillons de selles.

## 2. Résumé et explication du test

Les maladies à diarrhée sont un effet indésirable relativement fréquent des antibiothérapies. On observe, en particulier depuis l'introduction de la clindamycine au début des années 1970, une fréquence accrue des colites associées aux antibiotiques (CAA) sous des formes plus sévères, avec des signes et des symptômes caractéristiques d'une entérocolite pseudomembraneuse massive (EPM). La bactérie *Clostridium difficile* est considérée comme étant l'agent pathogène responsable de l'entérocolite pseudomembraneuse massive (EPM) et l'une des causes des CAA et DAA. La production des toxines A et B par les souches toxigènes de *Clostridium difficile* est d'une grande importance étiologique pour les manifestations cliniques de la maladie. Ces protéines, dont les masses moléculaires sont supérieures à 200 kDa, présentent des différences du point de vue fonctionnel et immunologique. La toxine A est une entérotoxine alors que la toxine B est une cytotoxine ; les effets de ces deux toxines sont synergiques *in vivo*. Étant donné que certaines souches de *Clostridium difficile* ne produisent pas de toxines et qu'environ 2 à 8 % des adultes sains et jusqu'à 50 % des enfants de moins de 2 ans peuvent être porteurs de *Clostridium difficile*, la caractérisation de ces toxines semble être plus importante dans la pratique que la détermination du micro-organisme pathogène.

Le test RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B ELISA est un dosage immunoenzymatique qui permet de déterminer spécifiquement et simultanément au moyen d'anticorps monoclonaux les toxines A et B dans les échantillons de selles des patients. Les résultats fiables du test sont disponibles en seulement deux heures, ce qui permet de prendre précocement des mesures thérapeutiques efficaces.

## 3. Principe du test

Le test RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B utilise des anticorps monoclonaux en appliquant une méthode de type sandwich. Ces anticorps monoclonaux qui ciblent les toxines A et B de *Clostridium difficile* se fixent sur la surface du puits de la microplaque.

Une suspension de l'échantillon de selles à examiner ainsi que des contrôles sont pipetés ensemble avec des anticorps antitoxines A et B monoclonaux biotinylés (conjugué 1) dans le puits de la microplaque, puis sont mis à incuber à température ambiante (20 à 25 °C). Après une étape de lavage, le conjugué polyperoxydase-streptavidine (conjugué 2) est ajouté et de nouveau mis à incuber à température ambiante (20 à 25 °C). Si des toxines sont présentes dans

l'échantillon de selles, les anticorps immobilisés, les toxines, et les anticorps conjugués forment un complexe sandwich. Le conjugué polyperoxydase-streptavidine non lié est éliminé au cours d'une autre étape de lavage.

Dans les échantillons positifs, l'ajout d'un substrat modifie l'enzyme liée dans la solution incolore qui tourne au bleu dans les puits de la microplaque. L'ajout d'un réactif d'arrêt fait virer la couleur du bleu au jaune. L'extinction est proportionnelle à la concentration des toxines A et B présentes dans l'échantillon.

#### 4. Réactifs fournis

Les réactifs fournis dans la trousse permettent de faire 96 déterminations.

Plate	96	Microplaque, 12 barrettes à micropuits (sécables) sur le support, revêtue d'anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement les toxines A et B de <i>Clostridium difficile</i>
Diluent   1	100 ml	Tampon de dilution d'échantillon, solution de NaCl tamponnée à la protéine, prêt à l'emploi, de couleur bleue
Wash	100 ml	Tampon de lavage, solution de NaCl tamponnée au phosphate (concentrée 10 fois), contient 0,1 % de thimérosal
Control   +	2 ml	Contrôle positif, toxine inactivée, prêt à l'emploi
Control   -	2 ml	Contrôle négatif (tampon de dilution d'échantillon), prêt à l'emploi
Conjugate   1	13 ml	Anticorps conjugués à la biotine ciblant les toxines A et B de <i>Clostridium difficile</i> dans une solution protéique stabilisée, prêts à l'emploi, de couleur bleue
Conjugate   2	13 ml	Conjugué polyperoxydase-streptavidine dans une solution protéique stabilisée, prêt à l'emploi, de couleur orange
Substrate	13 ml	Peroxyde d'hydrogène/TMB, prêt à l'emploi
Stop	12 ml	Réactif d'arrêt, acide sulfurique 1 N, prêt à l'emploi

#### 5. Les réactifs et leur stockage

Tous les réactifs doivent être entreposés entre 2 et 8 °C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Le tampon de lavage dilué peut être conservé entre 2 et 8 °C pendant 4 semaines maximum. La contamination microbienne doit être évitée.

Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.

Le sachet en aluminium doit être ouvert à l'aide de ciseaux sans déchirer le joint d'étanchéité. Les barrettes à micropuits qui ne sont pas nécessaires doivent être remises immédiatement dans le sachet en aluminium et conservées entre 2 et 8 °C.

Le substrat incolore doit également être protégé de la lumière directe pour éviter qu'il ne se décompose ou ne bleuisse sous l'effet d'une auto-oxydation. Lorsque le substrat est bleu, il ne doit pas être utilisé.

## 6. Autres réactifs et matériels nécessaires

### 6.1. Réactifs fournis

- Eau distillée ou désionisée

### 6.2. Équipement

- Tubes à essai
- Pipettes à usage unique (réf. Z0001)
- Agitateur-mélangeur vortex (facultatif, voir rubrique 9.3.)
- Micropipettes pour volumes de 50 à 100 µl et 1 ml
- Éprouvette graduée (1 000 ml)
- Chronomètre
- Appareil de lavage pour microplaques ou pipettes multicanaux (300 µl)
- Photomètre pour microplaques (450 nm et filtre de référence à 620-650 nm)
- Papier filtre (serviettes de laboratoire)
- Conteneur de déchets avec une solution d'hypochlorite à 0,5 %

## 7. Précautions à prendre par l'utilisateur

Uniquement pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Les instructions d'exécution du test doivent être respectées à la lettre.

Les échantillons ou réactifs ne doivent pas être pipetés à la bouche et tout contact avec une peau ou des membranes muqueuses lésées doit être évité. Lors de la manipulation des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons sont manipulés.

Pour en savoir plus, consulter la Fiche de données de sécurité (FDS) à l'adresse [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Le contrôle positif se trouvant dans la trousse contient de la toxine de *Clostridium difficile* inactivée ayant obtenu une réaction positive lors du test de cytotoxicité préalable à l'inactivation. Les toxines et les échantillons de selles doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux et manipulés conformément aux règlements de sécurité nationaux.

Le tampon de lavage contient du thimérosal à 0,1 % en tant que conservateur. Cette substance ne doit pas entrer en contact avec la peau ou les membranes muqueuses.

Après utilisation, veiller à mettre au rebut tous les réactifs et matériels d'une manière adéquate et responsable. Pour la mise au rebut, respecter les règlements nationaux.

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

Les échantillons de selles doivent être obtenus dès que possible, mais dans les trois jours qui suivent la survenue des premiers symptômes de diarrhée.

Avant utilisation, entreposer le matériel de test entre 2 et 8 °C. S'il n'est pas possible d'effectuer le test en l'espace de trois jours, il est préconisé de conserver le matériel à une température inférieure ou égale à -20 °C. Éviter de congeler et décongeler les échantillons plusieurs fois. Après dilution d'un échantillon de selles dans un tampon de dilution d'échantillon à 1/11, l'échantillon peut être conservé à 4 °C pour être utilisé dans les trois jours qui suivent.

Les échantillons de selles ne doivent pas être recueillis dans des conteneurs de transport renfermant un milieu de transport et des conservateurs, du sérum animal, des ions métalliques, des agents oxydants ou des détergents, car ces substances peuvent interférer avec le test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B.

Lorsque des frottis rectaux sont utilisés, il faut veiller à disposer d'une quantité nécessaire de selles pour effectuer le test (env. 100 mg).

La recherche des contacts doit inclure des échantillons de selles provenant des personnes ayant été en contact qui ne présentent pas de symptômes cliniques, afin d'identifier des porteurs asymptomatiques.

## 9. Procédures de test

### 9.1. Informations générales

Tous les réactifs et la microplaque **plate** doivent être ramenés à température ambiante (20 à 25 °C) avant utilisation. Les barrettes à micropuits ne doivent pas être retirées du sachet en aluminium avant d'avoir atteint la température ambiante. Les réactifs doivent être bien mélangés immédiatement avant leur utilisation. Après utilisation, les barrettes à micropuits (placées dans des sachets hermétiques) et les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Une fois utilisées, les barrettes à micropuits ne doivent pas être réutilisées. Les réactifs et les barrettes à micropuits ne doivent pas être utilisés si l'emballage est endommagé ou si les flacons fuient.

Pour éviter toute contamination croisée, les échantillons ne doivent pas entrer en contact direct avec les composants de la trousse. Le test ne doit pas être réalisé à la lumière directe du soleil. Nous recommandons de couvrir la microplaque ou de la sceller avec un film plastique pour éviter toute perte par évaporation.

### 9.2. Préparation du tampon de lavage

Mélanger 1 volume de concentré de tampon de lavage **Wash** avec 9 volumes d'eau distillée. Les cristaux éventuellement présents dans le concentré doivent dissous par réchauffement préalable (dans un bain d'eau à 37 °C).

### 9.3. Préparation des échantillons

Prendre un tube à essai marqué et le remplir avec 1 ml de tampon de dilution des échantillons RIDASCREEN® Diluent | 1. Aspirer un échantillon de selles liquides (environ 100 µl) au moyen d'une pipette à usage unique (réf. Z0001) jusqu'au-dessus du deuxième repère et ajouter au tampon du tube à essai pour obtenir une suspension. Pour obtenir une suspension avec des selles dures, ajouter une quantité équivalente de selles (environ 50 à 100 mg) prélevée à l'aide d'une spatule ou d'une anse de prélèvement à usage unique.

Homogénéiser la suspension de selles par aspiration, puis éjection avec une pipette à usage unique ou par mélange dans un agitateur-mélangeur vortex. Laisser la suspension reposer pendant une courte période (10 minutes) pour laisser aux particules grossières de selles le temps de se déposer ; le liquide clair surnageant la suspension de selles peut être directement utilisé pour le test. Si la procédure de test est effectuée dans un automate ELISA, ce liquide surnageant **doit** être dépourvu de particules. Dans ce cas, une centrifugation à 2 500 G pendant 5 minutes est recommandée.

#### **Remarque :**

Des échantillons de selles dilués dans le Diluent | 1 peuvent être soumis à tous les tests RIDASCREEN® ELISA qui utilisent le Diluent | 1.

### 9.4. Test des toxines provenant de cultures de *Clostridium difficile*

Pour étudier les colonies après culture sur des substrats solides (CFFA ou agar Schädler), utiliser une anse pour les prélever de la plaque d'agar, puis les mettre dans 1 ml de tampon de dilution des échantillons Diluent | 1 et bien mélanger. Dans ce cas, une centrifugation de la suspension est recommandée (2 500 G pendant 5 minutes). Le liquide clair surnageant peut être directement utilisé pour le test.

Pour étudier les cultures liquides, mettre en suspension 100 µl de l'échantillon dans 1 ml du tampon de dilution d'échantillon Diluent | 1 et bien mélanger. Dans ce cas, une centrifugation de la suspension est recommandée (2500 G pendant 5 minutes). Le liquide clair surnageant peut être directement utilisé pour le test.

#### **Remarque :**

La détermination des toxines dans une culture cellulaire de *Clostridium* ne peut être faite qu'après le début de la sporulation. Celle-ci, ainsi que l'excrétion correspondante de toxines, survient lors de la phase stationnaire tardive de croissance de l'agent pathogène, après épuisement de tous les nutriments.

### 9.5. Première incubation

Après avoir rempli une quantité suffisante de puits dans le support, ajouter 100 µl du Control | + positif, du Control | - négatif ou de la suspension de l'échantillon de selles (ou, si disponible, du surnageant de la suspension de colonies) dans les puits. Ajouter ensuite 100 µl de l'anticorps

conjugué à la biotine **Conjugate | 1** et mélanger (en tapotant légèrement le bord de la plaque), puis incuber pendant 60 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

#### 9.6. Lavage

Un lavage soigneux est important afin d'obtenir des résultats corrects ; il convient donc de suivre les instructions fournies à la lettre. La substance incubée dans les puits doit être déversée dans un conteneur de déchets pour une mise au rebut conformément aux réglementations locales. Retourner ensuite la plaque sur du papier absorbant et tapoter pour éliminer l'humidité résiduelle. Laver ensuite la plaque cinq fois systématiquement avec 300 µl de tampon de lavage. S'assurer que les puits sont complètement vidés en les tapotant après chaque lavage sur un morceau de papier absorbant encore sec et inutilisé.

En cas d'utilisation d'un laveur de microplaques ou d'un système ELISA entièrement automatisé, veiller à ce que l'appareil soit correctement réglé. Demander, au besoin, au fabricant de vous en fournir les réglages.

Les appareils fournis par R-Biopharm sont déjà programmés avec des réglages et des protocoles de travail validés. Pour éviter d'obstruer les aiguilles de lavage, il convient de n'utiliser que des suspensions de selles dépourvues de particules (voir paragraphe 9.3, Préparation des échantillons). S'assurer également que tout le liquide est aspiré à chaque étape de lavage.

#### 9.7. Deuxième incubation

À l'aide d'une pipette, ajouter 100 µl de conjugué polyperoxydase-streptavidine **Conjugate | 2** dans les puits, puis incuber pendant 30 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

#### 9.8. Lavage

Laver en suivant les instructions de la rubrique 9.6.

#### 9.9. Troisième incubation

Ajouter 100 µl de substrat **Substrate** dans tous les puits. Ensuite, incuber la plaque à température ambiante (20 à 25 °C), dans le noir, pendant 15 minutes. Remplir ensuite tous les puits avec 50 µl de réactif d'arrêt **Stop** afin d'arrêter la réaction. Après un mélange soigneux en tapotant légèrement le côté de la plaque, mesurer l'extinction à 450 nm (en variante : à 450/620 nm). Le réglage de la valeur nulle doit s'effectuer dans l'air, et donc sans la microplaque.

#### **Remarque :**

des échantillons de patients fortement positifs peuvent entraîner des précipités noirâtres du substrat.

#### 9.9 Protocole de test réduit

Les durées d'incubation décrites aux rubriques 9.5, 9.7 et 9.9 peuvent être fortement diminuées lorsque la plaque est incubée à 37 °C, avec une fréquence d'agitation de 20 à 25 Hz. (DSX®, Fa. Dynex). Les durées d'incubation sont modifiées comme suit :

1. Incubation 1 : 30 min
2. Incubation 2 : 15 min
3. Incubation 3 : 15 min

Des agitateurs de microplaques séparés conviennent aussi, par exemple le Thermomixer d'Eppendorf (réglage de la vitesse : 850 tr/min) ou le DTS-2 de LTF Labortechnik (réglage de la vitesse : 800 tr/min).

## 10. Contrôle qualité – signes de réactif périmé

À des fins de contrôle qualité, chaque fois qu'un test est effectué, il est nécessaire d'utiliser des contrôles positif et négatif, pour vérifier la stabilité des réactifs et la réalisation correcte du test. Le test s'est déroulé correctement lorsque la valeur d'extinction (DO) du contrôle négatif à 450 nm est inférieure à 0,02 (inférieure à 0,160 à 450/620 nm) et lorsque la valeur mesurée du contrôle positif est supérieure à 0,8 à 450 nm ou à 450/620 nm. Une valeur supérieure à 0,2 (0,160) pour le contrôle négatif pourrait indiquer que le lavage n'a pas été suffisant. Tout écart par rapport aux valeurs requises, par exemple la présence de turbidité ou d'une coloration bleue du substrat incolore avant le remplissage des puits, pourrait indiquer une dénaturation des réactifs.

En cas d'écart par rapport aux valeurs indiquées, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé (par ex. étalonnage)
- Procédure de test correcte
- Inspection visuelle des composants de la trousse à la recherche d'une contamination ou de fuites ; une solution de substrat devenue bleue ne doit pas être utilisée.

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir recommencé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.

## 11. Évaluation et interprétation

### 11.1. Calcul de la valeur seuil

Pour déterminer la valeur seuil, on ajoute 0,15 unité d'extinction à l'extinction mesurée du contrôle négatif.

$$\text{Valeur seuil} = \text{valeur d'extinction du contrôle négatif} + 0,15$$

## 11.2. Résultats du test

Un échantillon est estimé comme étant **positif** lorsque sa valeur d'extinction est supérieure de plus de 10 % à la valeur seuil calculée.

Un échantillon est estimé comme étant **limite** si sa valeur d'extinction se situe dans une plage allant de -10 % à +10 % de la valeur seuil. Si un nouvel examen utilisant un nouvel échantillon de selles obtient une valeur comprise dans cette même plage d'ombre, l'échantillon est considéré comme étant négatif.

Des échantillons ayant des valeurs d'extinction inférieures à -10 % de la valeur seuil calculée doivent être considérés comme étant **négatifs**.

## 12. Limites de la méthode

Le test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B indique la présence des toxines A et B de *Clostridium difficile* dans des échantillons de selles. Il n'est pas possible d'en déduire un rapport entre le niveau d'une valeur d'extinction déterminée et l'apparition ou la gravité des symptômes cliniques. **Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés en rapport au tableau clinique.**

Un résultat **positif** n'exclut pas la présence d'autres agents pathogènes infectieux.

Un résultat **négatif** n'exclut pas une éventuelle infection due à *Clostridium difficile*.

Il peut être causé par une décomposition protéolytique des toxines en cas de conditions de stockage insatisfaisantes. Si l'anamnèse est en faveur d'une suspicion d'infection par *Clostridium difficile* un autre prélèvement de selles doit être examiné.

Un résultat **limite** peut être causé par une répartition non homogène des toxines dans l'échantillon des selles. Dans un tel cas, l'examen doit être répété avec une deuxième suspension provenant du même échantillon ou il convient de demander un autre prélèvement de selles à examiner.

Des résultats de toxines négatifs dans une culture de *Clostridium difficile* réalisée à partir d'un échantillon de selles peuvent indiquer la présence de souches non toxigènes de *Clostridium difficile*. Pour clarifier un tel résultat, les colonies soupçonnées doivent être étudiées dans un test ELISA pour détecter une éventuelle production de toxines.

## 13. Performances

### 13.1. Qualité du test

Au cours d'une étude de prospection réalisée dans une grande clinique en Allemagne, 502 échantillons de selles de patients suspectés d'être atteints de DACD (diarrhée associée à

*Clostridium difficile*) ont été étudiés avec le test RIDASCREEN® ELISA et d'autres tests Elisa du commerce, puis ont été comparés au test de cytotoxicité défini comme norme. Le test RIDASCREEN® ELISA a présenté la meilleure concordance avec le test défini comme norme. Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Comparaison du test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B avec le test défini comme norme (test de cytotoxicité avec neutralisation)

		RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B	
		pos	neg
Test défini comme norme	pos	61	7
	neg	14	420

Sensibilité :	89.7 %
Spécificité :	96.8 %
Prévisibilité positive :	81.3 %
Prévisibilité négative :	98.4 %

### 13.2. Réactivité croisée

Différents micro-organismes pathogènes du tractus intestinal ont été examinés avec le test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ELISA et n'ont pas présenté de réactivité croisée. Ces tests ont été réalisés avec des suspensions de bactéries ( $10^6$  à  $10^9$  ufc/ml), avec des cultures de parasites ( $10^7$  à  $10^9$  organismes/ml) et avec des cultures de cellules infectées par le virus. Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Réactivité croisée avec des micro-organismes pathogènes du tractus intestinal

Organisme	Résultat [DO 450]
Adénovirus	0,060
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,057
Astrovirus	0,055
<i>Bacillus cereus</i>	0,053
<i>Bacteroides fragilis</i>	0,058
<i>Campylobacter coli</i>	0,061
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,059
<i>Candida albicans</i>	0,066
<i>Citrobacter freundii</i>	0,055
<i>Cryptosporidium muris</i>	0,061
<i>Cryptosporidium parvum</i>	0,054

<i>E. coli</i> (EPEC)	0,060
<i>E. coli</i> (EPEC)	0,054
<i>E. coli</i> (EPEC)	0,053
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,059
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,054
<i>Giardia lamblia</i>	0,056
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,054
<i>Proteus vulgaris</i>	0,055
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,055
Rotavirus	0,056
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,063
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,062
<i>Serratia liquefaciens</i>	0,053
<i>Shigella flexneri</i>	0,067
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,065
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,055
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,054
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,053

### 3.2.1. Spécificité des souches :

Les souches de Clostridium suivantes ont obtenu un résultat négatif avec le test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ELISA : *C. bifermentans*, *C. butyricum*, non toxigène *C. difficile* (3 souches), *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. sporogenes*, *C. tetani*.

### 13.3. Précision

La reproductibilité du test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ELISA a été étudiée avec six références qui couvrent l'ensemble de la plage de mesure des valeurs négatives à fortement positives. Pour déterminer la reproductibilité intra-test, 40 répétitions de ces références ont été mesurées. Les valeurs moyennes et les coefficients de variation (CV) ont été déterminés pour trois lots de trousse. Pour ce qui est de la reproductibilité inter-tests, les références de dix jours de travail successifs ont été mesurées en double, avec deux passages par jour. Les mesures ont été effectuées par trois techniciens et trois lots de trousse. La reproductibilité inter-lots a été déterminée sur les trois lots de trousse.

Référence Valeur moyenne/CV	Intra-test			Inter-tests			Inter-lots
	Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lots des trousses 1-3
1	1,181 / 5,09%	1,307 / 6,13%	1,175 / 4,28%	1,256 / 13,93%	1,218 / 12,86%	1,211 / 11,33%	1,228 / 12,78%

2	0,867 / 6,25%	0,895 / 4,59%	0,879 / 4,81%	0,947 / 15,51%	0,900 / 14,41%	0,897 / 12,47%	0,915 / 14,24%
3	0,659 / 6,01%	0,665 / 5,16%	0,616 / 7,61%	0,620 / 17,87%	0,596 / 16,85%	0,601 / 12,45%	0,605 / 15,94%
4	0,428 / 9,64%	0,461 / 4,74%	0,462 / 3,30%	0,471 / 20,13%	0,445 / 18,24%	0,482 / 18,32%	0,466 / 18,98%
5	0,320 / 8,42%	0,337 / 5,69%	0,300 / 4,71%	0,319 / 24,51%	0,293 / 19,98%	0,319 / 14,19%	0,310 / 20,14%
6	0,046 / 5,60%	0,049 / 6,91%	0,053 / 15,40%	0,058 / 24,16%	0,058 / 20,54%	0,059 / 15,37%	0,058 / 20,33%

#### 13.4. Sensibilité analytique

Les limites de détection analytique des toxines A et B de *Clostridium difficile* ont été déterminées séparément. La limite du blanc (LB) a été déterminée avec 270 tests avec des échantillons négatifs et pour les toxines A et B, les limites de détection (LD) ont été analysées dans 90 tests pour chacune. Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : LB et LD

	DO (450 nm)	Concentration analy- tique dans l'échantil- lon (ng/ml)	Concentration analytique dans la suspension de l'échantillon (1+10 dans le diluant) (ng/ml)
<b>LB</b>	0,073	-	-
<b>LD (toxine A)</b>	0,132	1,56	0,156
<b>LD (toxine B)</b>	0,117	1,56	0,156

#### 14. Substances interférentes

Les substances mentionnées ci-dessous n'ont pas présenté d'effet sur les résultats du test lorsqu'elles ont été mélangées dans les concentrations spécifiées dans des échantillons de selles positifs pour les toxines A/B de *C. difficile* et négatifs pour les toxines A/B de *C. difficile* : sulfate de baryum (5 % p/p), lopéramide (antidiarrhéique, 5 % p/p), Pepto-bismol (antidiarrhéique, 5 % v/p), mucines (5 % p/p), cyclamate de sodium (édulcorant artificiel, 5 % v/p), sang humain (5 % v/p), acide stéarique/acide palmitique (mélange 1:1, 40 % p/p), métronidazole (0,5) (antibiotique, 5 % v/p), diclofénac (0,00263 % v/p)

## Annexe

Symboles spécifiques au test :

Plate	Microplaque
Diluent 1	Tampon de dilution d'échantillon
Wash	Tampon de lavage
Control  +	Contrôle positif
Control  -	Contrôle négatif
Conjugate   1	Conjugué 1
Conjugate   2	Conjugué 2
Substrate	Substrat
Stop	Réactif d'arrêt

## Bibliographie

1. Lyerly, D.M. et al.: Clostridium difficile: Its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. (1988); 1: 1-18.
2. Knoop, F.C. et al.: Clostridium difficile: Clinical disease and diagnosis. Clin. Microb. Rev. (1993); 6: 251-265.
3. Kelly, C.P. et al.: Clostridium difficile Colitis. New Engl. J. Med. (1994); 330: 257-262.
4. Sullivan, N.M. et al.: Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. (1982); 35: 1032-1040.
5. Thomas, D.R. et al.: Postantibiotic colonization with Clostridium difficile in nursing home patients. J. Am Geriatr. Soc. 38, 415-420 (1990).
6. Bartlett, J.G.: Clostridium difficile: Clinical considerations. Rev. Infect. Dis. (1990); 12: 243-251.
7. Loeschke, K., Ruckdeschel, G.: Antibiotikaassoziierte Kolitis - aktualisiert. Internist (1989); 30: 345-353.
8. Enzensberger, R. et al.: Clostridium difficile-induzierte Enterokolitis. DMW(1986); 111: 56-59.
9. Cefai, C. et al.: Gastrointestinal carriage rate of Clostridium difficile in elderly, chronic care hospital patients. J. Hosp. Infect. (1988); 11: 335-339.
10. Samore, M.H. et al.: Wide diversity of Clostridium difficile types at a tertiary referral hospital. J. Infect. Dis. (1994); 170: 615-621.
11. Lipsett, P.A. et al.: Pseudomembranous colitis: A surgical disease? Surgery (1994); 116: 491-496.
12. Asha, N.J. et al.: Comparative analysis of prevalence, risk factors and molecular epidemiology of Antibiotic –associated diarrhea due to Clostridium difficile, Clostridium perfringens, and Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol. (2006); 44: 2785-2791.
13. Voth, D.E., Ballard, J.: Clostridium difficile toxins: Mechanism of action and role in disease. J. Clin. Microbiol. (2005); 18: 247-263.
14. Borgmann, S. et al.: Increased number of Clostridium difficile infections and prevalence of Clostridium difficile PCR ribotype 001 in southern Germany. Eurosurveillance (2008); Vol 13: No.49.
15. Mc.Donald, L.C. et al.: An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. N.Engl.J.Med. (2005); 353: 23.
16. Loo, V.G. et al.: A predominantly clonal multi-institutional outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N.Engl.J.Med. (2005); 353: 23.
17. Bartlett, J.G., Gerding, D.N.: Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. CID (2008); 46(Suppl. 1): 12-18.