

# FASTest® C. diff 2T

ad us.vet.



In vitro Diagnostikum

Testkit zum qualitativen Nachweis der GDH und der Toxine A/B aus *Clostridioides difficile* im Kot von Hund, Katze, Pferd und Schwein

## GEBRAUCHSINFORMATION

DIAGNOSTIK  
**MEGACOR**  
6912 Hörbranz – AUSTRIA  
www.megacor.com

## 1. INFORMATIONEN ZUM TESTKIT

### TESTKITKOMPONENTEN

1 Testkit **FASTest® C. diff 2T** enthält:

- 10 Revolver-Teströhrchen **R** mit je 2 Teststreifen, beschichtet mit monoklonalen Antikörpern
- 10 Probenröhrchen **P** mit je 1,0 ml Pufferlösung
- 10 Einmal-Kunststoffpipetten
- 1 Gebrauchsinformation

### HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Lagerung: 15–25°C  
Verwendbar bis: – siehe Etikett

### ANWENDUNG UND ABKÜRZUNGEN

- Für den tierärztlichen Gebrauch
- In vitro Diagnostikum
- Gebrauchsinformation genau beachten
- LOT: Chargen-Bezeichnung
- Keine Reagenzien verschiedener Testkits, Chargennummern oder mit abgelaufenem Verfallsdatum verwenden.

TL – TESTlinie, KL – KONTROLLlinie, LF – Lateral flow  
R – Revolver-Teströhrchen, P – Probenröhrchen

### HAFTUNG

Das gesamte Haftungsrisiko im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produktes liegt beim Käufer. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für indirekte, spezielle oder daraus folgende Schäden jeglicher Art, die aus der Benutzung, Testdurchführung und -auswertung dieses Produktes resultieren.

## 2. EINLEITUNG

*Clostridioides difficile* ist ein grampositiver, anaerober Sporenbildner. Es verursacht Durchfallerkrankungen bei verschiedenen Tierarten. Studien belegen auch das Vorkommen von *C. difficile* in tierischen Lebensmitteln, sodass von einem zoonotischen Potential für den Menschen (Diarrhoe, Colitis) auszugehen ist. Zudem gibt es Hinweise von gegenseitiger Übertragung zwischen Hund/Katze und Mensch innerhalb eines Haushaltes. Wichtigste Virulenzfaktoren für die Entstehung der *C. difficile*-Infektion (CDI) sind Enterotoxin A (TcdA) bzw. Zytotoxin B (TcdB).  
**Hund/Katze:** *C. difficile* kann sowohl im Kot gesunder juveniler wie adulter Tiere, als auch bei Tieren mit Diarrhoe (Einzeltiere, nosokomiale Infektionen in Tierkliniken/Tierheimen) nachgewiesen werden. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen *C. difficile* und Durchfall konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigten Kotproben diarrhoischer Tiere signifikant höhere TcdA (vermehrte Sekretion von Flüssigkeit ins Darmlumen) und/oder TcdB (letale Schädigung der Darmwand) Nachweise als bei gesunden Tieren.  
**Pferd:** Sowohl beim Einzeltier als auch bei Diarrhoe-Ausbrüchen in Herden kommen v. a. bei Fohlen CDI (TcdA & TcdB), teils assoziiert mit *C. perfringens*, dann mit oft tödlichem Verlauf innerhalb von 3 Tagen vor. Klinisch hinweisend sind Koliken z. T. ohne/bevor ein Durchfallgeschehen zu beobachten ist sowie antibiotika-assoziierte massive Kolliden.  
**Schwein:** Bei 1–7 Tage alten Ferkeln stellt die CDI eine der wichtigsten Durchfallerkrankungen (Mortalität bis zu 16%) dar, deren Prävalenz mit steigendem Alter allerdings drastisch abfällt. Die fäkal-orale Besiedlung mit *C. difficile* erfolgt in endemischen Gebieten zu 100% innerhalb der ersten 48h, sowie lactogen durch die Muttersau (ca. 25%) oder aerogen durch die Umgebung. Klinische Symptome (gelb-wässriger Durchfall, aber auch Verstopfung) sind nicht immer zu sehen. Risikofaktoren für die Entstehung der akuten CDI sind Alter, Provokationsdosis, aber auch assoziierte Toxine sowie die Gabe von Antibiotika. Folgen sind Wachstumsretardierung sowie geringeres Absetzgewicht und erhebliche wirtschaftliche Verluste. Der Diagnose einer akuten CDI kann aufgrund der endemischen Natur von *C. difficile* erschwert sein. Durch eine Zwei-Stufen-Diagnostik der GDH (Glutamat-Dehydrogenase) sowie der Toxine A/B kann der Nachweis mit hoher Sicherheit gelingen. Der Nachweis der GDH gilt als sehr sensitiv im Vergleich zur Kultur (Goldener Standard) und kann daher als sog. „Aus-schlussstest“ verwendet werden. Der Nachweis der Toxine A/B dagegen gilt als hochspezifisch, dafür weniger sensitiv im Vergleich zur Kultur. Daher ist der Doppeltest optimal als Bestätigungstest anwendbar. In Kombination mit der Anamnese und Klinik eignet sich der **FASTest® C. diff 2T** als Vor-Ort-Diagnostiktest zum sicheren Ausschluss bzw. Nachweis einer *C. difficile*-Infektion.

## 3. INFORMATIONEN ZUM PROBENMATERIAL

Auf Grund der i. d. R. inhomogenen oder „nesterartigen“ Verteilung von Antigenen in der Kotprobe vor Probenentnahme muss diese mit Hilfe eines Spatels oder Vortex-Mixers homogen verührt werden.

Für den Test wird, je nach Konsistenz, die unter Punkt 4b/Probenvorbereitung vorgeschriebene Menge (unter Verwendung des beigefügten Löffelchens bzw. Pipette) an Kot benötigt!

Ungekühlt (15–25°C) sollte der Kot möglichst frisch getestet werden! Bei 2–8°C kann die Probe bis max. 2 Tage, dauerhaft bei mindestens –20°C gelagert werden.

Beachten Sie, dass das Probenmaterial, ebenso wie alle verwendeten Testkitkomponenten, zum Zeitpunkt der Anwendung **Raumtemperatur** haben sollte.

**Endogene und exogene Störsubstanzen einer Probe** (z. B. Proteasen, Mukosabestandteile, Blut, aber auch Viskosität, pH-Wert sowie Gräser und Katzenstreu) können **Störeffekte** (Matrixeffekte) verursachen, die die Messung des Targets beeinflussen können. Diese können zu gestörtem LF und/oder unspezifischen Reaktionen auf TL und KL führen.

## 4. PROBENVORBEREITUNG

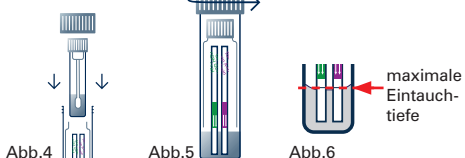
a. Öffnen Sie das Probenröhrchen **P** mit der Pufferlösung.



- b. **Homogenisieren Sie die Kotprobe mit Hilfe eines Spatels oder Vortex-Mixers** und rühren Sie die Probenmenge gleichmäßig in die Pufferlösung ein (Abb.1: **breiig-fester Kot: 75 mg** [½ gestrichenes Löffelchen] bzw. **breiig-wässriger Kot: 3 Tropfen** mit der beigefügten Pipette ± 75 µl).
- c. **P** gut verschließen. Kotprobe durch leichtes, kreisförmiges Schwenken möglichst homogen mit der Pufferlösung vermischen (Abb.2). Keine Sedimentation erforderlich. Sofort mit der Testdurchführung 5.1 beginnen.

## 5. TESTDURCHFÜHRUNG

- Entnehmen Sie das Revolver-Teströhrchen **R** erst kurz vor Gebrauch dem Testkit.
- Öffnen Sie **R**, entfernen Sie das rote Trocknungsmittelplättchen (Abb.3) und führen Sie **P** mit der Proben-Puffer-Mischung (PPM) senkrecht in **R** ein (Abb.4).
- Drehen Sie den Deckel von **R** fest zu, bis es zweimal knackt (Abb.5). Die PPM aus **P** fließt nun in **R**. Um einen ordnungsgemäßen LF zu gewährleisten, darf der Flüssigkeitsspiegel die weißen Saugpadbereiche der Teststreifen nicht übersteigen (Abb.6, siehe auch 7. Vorsichtsmaßnahmen\*).
- Stellen Sie **R** zur Inkubation auf eine ebene und horizontale Fläche.



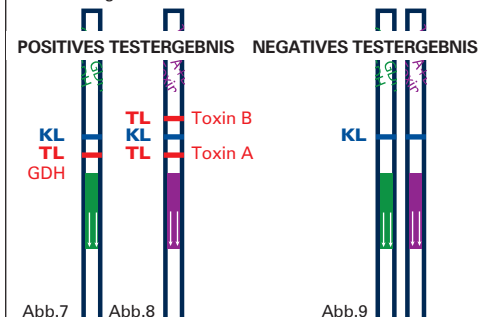
## 6. ABLESEN DES TESTERGEBNISSES

Das Testergebnis ist nach einer Inkubationszeit von **exakt 15 Minuten** abzulesen. Positive Testresultate können je nach Antigenkonzentration schon früher auftreten.

**POSITIVES TESTERGEBNIS** (Abb.7+8)  
Eine (GDH) oder zwei (Toxin A/B) **rote TESTlinie/n** **jedweder Intensität** (variabel von sehr schwach bis stark intensiv) und eine **blaue KONTROLLlinie** erscheinen.

**NEGATIVES TESTERGEBNIS** (Abb.9)  
Nur eine **blaue KONTROLLlinie** erscheint. Diese Linie zeigt, unabhängig von ihrer Intensität, die korrekte Testdurchführung an.

**UNGÜLTIGES TESTERGEBNIS**  
Es ist keine KONTROLLlinie sichtbar. Der Test muss unter Verwendung eines neuen **P** und **R** wiederholt werden\*.



## 7. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Es wird empfohlen, Einmal-Handschuhe und weitere persönliche Schutzausrüstung (Schutzkleidung, evtl. Mundschutz) zu tragen. Nach Abschluss des Tests die Hände waschen und desinfizieren.
- Beschriften Sie Probenmaterial, zugehöriges Probenröhrchen **P** und Revolver-Teströhrchen **R**, damit die exakte Zuordnung gewährleistet ist.
- Für jede Probe ein neues Probenröhrchen **P** und Revolver-Teströhrchen **R** verwenden.
- Die Pufferlösung enthält geringgradige Konzentrationen an toxischem Natriumazid als Konservierungsmittel. Haut-/Augenkontakt und/oder Ingestion sind unbedingt zu vermeiden!
- Das Probenmaterial muss als potentiell infektiös angesehen werden und ist mit den verwendeten Testkitkomponenten nach der Testdurchführung fachgemäß zu entsorgen.

\* Sollte der LF nicht innerhalb einer Minute nach vollständigem Verschließen des Deckels von **R** starten, schwenken Sie **R** 1–2x vorsichtig kreisförmig.

Sollte der LF immer noch nicht starten, wurde evtl. eine zu große Kotmenge verwendet. Der Test muss komplett wiederholt/neu angesetzt werden. Dabei exakt die Anweisungen zur Probenvorbereitung beachten (siehe auch 4.b/Probenvorbereitung bzw. Abb.1).

## 8. TESTPRINZIP

Der **FASTest® C. diff 2T** basiert auf einem immunochromatographischen „Sandwich-Prinzip“. Die in der Proben enthaltene Glutamat-Dehydrogenase (GDH) bzw. Toxin A/B aus *C. difficile* werden durch die Pufferlösung aus der Matrix Kot extrahiert und reagieren im Bereich des Konjugatantikörpers mit mobilen, an rote Latexpartikel gebundenen Antikörpern gegen GDH bzw. Toxin A/B und bilden jeweils Antigen-Antikörper-Komplexe. Diese Ag-AK-Komplexe durchfließen die Membran („lateral flow“, **LF**) und werden unter Ausbildung einer roten TESTlinie (**TL**) an membranfixierte spezifische monoklonale Antikörper gegen GDH bzw. Toxin A/B gebunden. Die korrekte Testausführung wird durch die Ausbildung einer zweiten, blauen KONTROLLlinie (**KL**) angezeigt.

## 9. INFORMATIONEN ZUR TESTAUSWERTUNG

- Die Interpretation des abgelesenen Testergebnisses sollte im Rahmen der Anamnese, Klinik, Therapie- und Prophylaxemöglichkeiten betrachtet werden.
- Jegliche nicht beschriebenen Farb- und Konturabweichungen von TL und KL (z. B. gräuliche, schattenartige Linien) sind als unspezifische Reaktionen und somit als negatives Testergebnis zu werten.
- ACHTUNG:** Bei Kotproben mit hohem Blutgehalt kann es v. a. bei negativen Proben zu unspezifischen Reaktionen auf der TL und KL kommen. Häufig verfärbt sich die KL von hellblau nach dunkelblau bzw. purpur.
- Ein Probenüberschuss kann zu verzögertem bzw. unvollständigem lateral flow führen (keine Ausbildung der KL).

Der Test muss mit einem reduzierten Probenvolumen (unter Berücksichtigung des Proben-Puffer-Verhältnisses) wiederholt werden.

### Testinterpretation

- GDH positiv und Toxin A und/oder Toxin B positiv  
Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit liegt eine akute Infektion mit toxinbildenden *C. difficile* vor.
- GDH negativ und Toxin A und Toxin B negativ  
Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit liegt **keine** akute Infektion mit toxinbildenden *C. difficile* vor.
- Die TL kann sowohl in Intensität und/oder Breite (gewisse Korrelation zur GDH- bzw. Toxin-Konzentration in der Probe) als auch in zeitlichem Erscheinen variieren.
  - Proben mit sehr schwacher TL können mit höherem Probenvolumen (unter Berücksichtigung des Proben-Puffer-Verhältnisses) wiederholt werden.
  - Positive Testergebnisse können auch schon vor Ende der Inkubationszeit auftreten. Nach Ablauf der Inkubationszeit sind TL nicht interpretierbar!
- Trotz des hohen negativen prädiktiven Wertes des GDH-Tests kann eine *C. difficile*-Infektion nicht vollständig ausgeschlossen werden. Bei bestehender klinischer Verdachtsdiagnose (zunehmende Durchfallintensität) wird eine Testwiederholung nach 12–24 Stunden empfohlen.
- Ein negatives GDH- und positives Toxin A/B-Ergebnis aus festem Kot muss kritisch betrachtet werden und im Zusammenhang mit Anamnese und Klinik (*C. difficile* verursacht eigentlich Durchfall!) betrachtet werden.
- Kreuzreaktionen mit *E. histolytica* sind möglich (Toxin A negativ, Toxin B schwach positiv).

# FASTest® C. diff 2T

ad us. vet.



In vitro diagnosticum

Test-kit for the qualitative detection of GDH and of Toxins A/B from *Clostridioides difficile* in feces of the dog, cat, and horse and pig

## INSTRUCTIONS FOR USE



6912 Hörbranz – AUSTRIA  
www.megacor.com

## 1. INFORMATION ON THE TEST-KIT

### TEST-KIT COMPONENTS

1 test-kit **FASTest® C. diff 2T** contains:

- 10 revolver test tubes **R** with 2 dipsticks each, coated with monoclonal antibodies
- 10 sample tubes **P** with 1.0 ml buffer diluent each
- 10 disposable plastic pipettes
- 1 instructions for use

### STABILITY AND STORAGE

Store at  
15–25°C

Expiry date  
– see label

### APPLICATION AND ABBREVIATIONS



For veterinary use only



Lot number



In vitro diagnosticum



Do not use test-kit components from different kits, lot numbers or beyond stated expiry date.



Follow instructions for use precisely

**TL** – TEST line, **CL** – CONTROL line, **LF** – Lateral flow  
**R** – Revolver test tube, **P** – sample tube

### LIABILITY

The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from the use of this product.

## 2. INTRODUCTION

*Clostridioides difficile* is a gram positive anaerob spore former. It causes diarrhoea in various species. Studies prove the incidence of *C. difficile* in animal food. Therefore, a zoonotic potential for humans (diarrhoea, colitis) must be implied. Additionally there are hints of mutual transfer between dog/cat and human within a household.

Most important virulence factors for the development of *C. difficile* infection (CDI) are the enterotoxin A (TcdA) and cytotoxin B (TcdB).

**Dog / cat:** *C. difficile* can be proven in feces of healthy juvenile and adult animals as well as in animals with diarrhoea (single animals, nosocomial infections in animal hospitals and shelters). A significant correlation between *C. difficile* and diarrhoea could not be proven, but feces samples of animals with diarrhoea showed significantly higher TcdA (increased secretion of liquid into the intestinal lumen) and/or TcdB (lethal damage of the intestinal wall) detection as with healthy animals.

**Horse:** Both in single animals and with diarrhoea outbreaks in herds CDI (TcdA & TcdB) occur, especially in foals, partly associated with *C. perfringens*, then mostly with deathly course within 3 days. Clinically indicative are colic, partly without/before diarrhoea onset and massive antibiotic associated colitis.

**Pig:** In 1–7 days old piglets, CDI is one of the most important diarrhoea diseases (mortality up to 16%). The prevalence decreases with increasing age. The fecal-oral colonisation with *C. difficile* happens in endemic areas at 100% within 48h, lactogenic via the sow (ca. 25%) or aerogenic via surroundings. Clinical symptoms (yellow-watery diarrhoea, but also constipation) are not always visible. Risk factors for development of an acute CDI are age, provocation dose, but also associated toxins and the administration of antibiotics. Retarded growth, lower weaning weight and severe economical losses are the consequences.

Diagnosis of an acute CDI can be difficult due to the endemic nature of *C. difficile*. With a two-step diagnostics of GDH (Glutamate Dehydrogenase) and the Toxins A/B, the proof can succeed with high certainty. The proof of GDH is said to be very sensitive compared to culture (gold-standard) and therefore can be used as so-called "exclusion test". On the other hand, the proof of the Toxins A/B is seen as highly specific (but less sensitive) compared to culture. Therefore, the double test can be optimally used as confirmation test.

In combination with anamnesis and clinic, the **FASTest® C. diff 2T** is suitable as on-site diagnostic test for the secure exclusion or proof of a *C. difficile* infection.

## 3. INFORMATION ON THE SPECIMEN MATERIAL

Due to the normally inhomogeneous or nest-like dissemination of antigens in the feces, the specimen material has to be mixed up homogeneously (spatula, vortex-mixer) before sampling.

For the test, the required amount of feces as described in issue 4b/Specimen collection and preparation, is needed. Use the attached spoon or pipette.

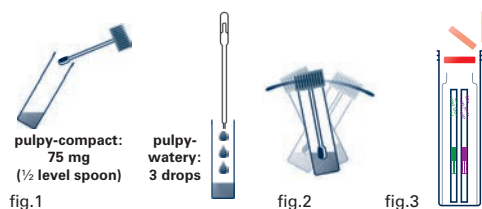
Non-cooled (15–25°C), the sample should be tested as fresh as possible! At 2–8°C, the sample can be stored up to 2 days, permanently at minimum –20°C.

Keep in mind that the sample material, as well as all used test-kit components, should have **room temperature** at the time of application.

**Endogenous and exogenous interfering substances of the sample** (e.g. proteases, mucosa components, blood, but also viscosity, pH value as well as grass and cat litter) can cause interferences (matrix effects) that can influence the target measurement. These can lead to an impaired LF and/or unspecific reactions on TL and CL.

## 4. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

a. Open the sample tube **P** with the buffer diluent.



pulpy-compact:  
75 mg  
(1/2 level spoon)

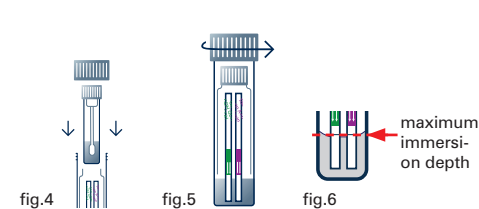
pulpy-watery:  
3 drops

b. **Homogenise the feces sample (applicator, vortexer)** and mix the required sample volume steadily into the buffer diluent (fig.1: **pulpy-compact feces: 75 mg** [1/2 level spoon] or **pulpy-watery feces: 3 drops** with the attached pipette  $\approx 75 \mu\text{l}$ ).

c. Close **P** tightly. Rotate feces sample easily to get the mixture as homogeneous as possible (fig.2). No sedimentation required. Immediately start with the test procedure 5.1.

## 5. TEST PROCEDURE

1. Remove the revolver test tube **R** from the test-kit shortly before use.
2. Open **R**, remove the red desiccant disk (fig.3) and introduce **P** containing the sample-buffer mixture (SBM) vertically into **R** (fig.4).
3. Turn the cap of **R** until hearing a clicking noise twice (fig.5). The SBM of **P** will run into **R**. To ensure a proper LF, the liquid level must not exceed the white sucking pad of the dipsticks (fig.6, see also 7. Precautions for users\*).
4. Place **R** on a flat and horizontal surface for incubation.



## 6. READING OF THE TEST RESULT



Read the test result after **exactly 15 minutes**. Positive test results may be observed earlier, depending on the concentration of antigen in the sample.

### POSITIVE TEST RESULT (fig.7+8)

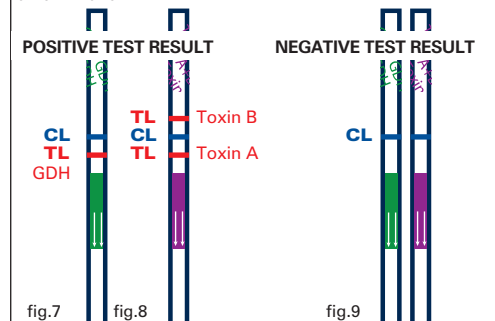
One (GDH) or two (Toxin A/B) **red TEST line/s of any intensity (varying from very weak to strongly intensive)** and a **blue CONTROL line** appear.

### NEGATIVE TEST RESULT (fig.9)

Only a **blue CONTROL line** appears. This line indicates, irrespective of its intensity, that the test has been performed properly.

### INVALID TEST RESULT

No CONTROL line visible. The test should be repeated using a new **P** and **R** \*.



## 7. PRECAUTIONS FOR USERS

- The guidelines for working in medical laboratories must be observed. It is recommended to wear disposable gloves and other personal protective equipment (protective clothing, possibly a face mask). Wash and disinfect hands after completing the test.
- Label sample material, associated sample tube **P** and revolver test tube **R** to ensure a precise assignment.
- Use a new sample tube **P** and revolver test tube **R** for each sample.
- The buffer diluent contains low concentrations of toxic sodium azide as a preservative, therefore avoid skin/eye contact and/or ingestion.
- The sample material must be seen as potentially infectious and disposed of accordingly, together with the used test-kit components.

\* If the LF does not appear one minute after closing the cap of **R** completely, swing **R** carefully 1–2x in a circle.

If the LF still does not appear, maybe a too large amount of feces was used. The test must be completely repeated/rescheduled. Carefully observe the advice for sample preparation (also see 4.b/ Specimen collection and preparation and fig.1).

## 8. TEST PRINCIPLE

The **FASTest® C. diff 2T** is based on latest rapid immunochromatographic "sandwich technique".

Glutamate dehydrogenase (GDH) or Toxin A/B from *C. difficile* present in the sample are extracted from the feces by the buffer diluent and will react in the conjugate pad area with mobile monoclonal antibodies against GDH or Toxin A/B, bound to red latex particles, and form antigen-antibody complexes. These complexes migrate along the membrane ("lateral flow", **LF**) and are bound by fixed specific monoclonal antibodies against GDH or Toxin A/B, producing a red TEST line (**TL**).

The correct test procedure will be indicated by a second, blue CONTROL line (**CL**).

## 9. INFORMATION FOR THE INTERPRETATION

- The interpretation of the test result should always be based on anamnestic and clinical data as well as the therapy and prophylaxis possibilities.
- Any non-described colour or contour variation of TL and CL (e.g. greyish, shadow-like lines) has to be considered as unspecific reaction and therefore as negative test result.
- **ATTENTION:** In case of feces samples with high blood content, especially with negative samples, unspecific reactions on TL and CL can occur. Frequently, the CL changes colour from light blue to dark blue or purple.

- A sample overload can lead to delayed or incomplete lateral flow (no formation of CL). The test must be repeated with a reduced sample volume (considering the sample-buffer diluent ratio).

### Test interpretation

- GDH positive and Toxin A and/or Toxin B positive  
With a high probability, an acute infection with toxigenic *C. difficile* is going on.
- GDH negative and Toxin A and Toxin B negative  
With a high probability, no acute infection with toxigenic *C. difficile* is going on.
- The TL can vary both in intensity (certain correlation to toxin or GDH concentration in the sample) and in time of appearance.
  - Samples with very low TL can be repeated with higher sample volume (considering the sample-buffer diluent ratio).
  - Positive test results may be observed before end of incubation time. After end of incubation time, TL are not interpretable!
- In spite of the high negative predictive value of the GDH test, a *C. difficile* infection cannot be excluded completely. In case of consisting clinical suspicion diagnosis (increasing intensity of diarrhoea), a test repetition after 12–24 hours is recommended.
- A negative GDH and positive Toxin A/B test result from solid feces must be seen critical and be evaluated in connection with anamnesis and clinic (*C. difficile* actually causes diarrhoea!).
- Cross reactions with *E. histolytica* are possible (Toxin A negative, Toxin B weak positive).