

C. difficile ToxA + ToxB + GDH Combo Test Device (Heces) CDF-F43

USO

La prueba combinada C. difficile ToxA + ToxB + GDH de C. difficile (heces) es un inmunoensayo cromatográfico rápido para la detección cualitativa simultánea de toxina A, toxina B y glutamato deshidrogenasa (GDH) del Clostridium difficile en heces humanas. Es un test para la detección simple y altamente sensible para hacer un diagnóstico presuntivo de infección por Clostridium difficile. La prueba es solo para uso profesional.

INTRODUCCION

C. difficile es un bacilo anaerobio gram positivo formador de esporas. Las cepas toxigénicas de C. difficile producen dos toxinas diferentes que constituyen los factores de virulencia esenciales para la infección por C. difficile (ICD), y se considera responsable de aproximadamente el 25% de los episodios de diarrea relacionados con el consumo de antibióticos. La ICD puede conducir a colitis pseudomembranosa, que requiere tratamiento urgente con antibióticos efectivos contra C. difficile ya que, sin tratamiento, la ICD puede comprometer gravemente la vida de los pacientes. En el caso de la colitis pseudomembranosa, la mortalidad por CDI puede llegar a ser del 6% al 30%^{1,2}.

La enfermedad debida a C. difficile se desarrolla cuando se permite que el microorganismo proliferare en el colon, comúnmente, después del uso de antibióticos que hayan eliminado la flora competidora.

C. difficile puede liberar dos toxinas de alto peso molecular, la toxina A y la toxina B, que son responsables de las manifestaciones clínicas, que van desde diarrea acuosa leve y autolimitada hasta colitis pseudomembranosa fulminante, megacolon tóxico y muerte.

La glutamato deshidrogenasa (GDH) de Clostridium difficile es una enzima producida en grandes cantidades por todas las cepas toxigénicas y no toxigénicas, lo que la convierte en un excelente marcador para el organismo. La mayor utilidad de la prueba de GDH es su uso como pantalla para descartar muestras negativas y para seleccionar muestras para pruebas adicionales.

La población asintomática puede ser portadora de C. difficile toxigénico, entre los cuales, algunos pueden ser cepas epidémicas. El diagnóstico y la diferenciación de la toxina A y la toxina B de C. difficile desempeñan un papel fundamental tanto en el tratamiento rápido como en el control de la transmisión de la enfermedad³.

Los métodos de diagnóstico actuales de ICD son principalmente la detección cualitativa de bacterias, toxinas o genes de toxinas. El inmunoensayo rápido de ICD se ha vuelto más importante debido a la disponibilidad de diagnóstico directo y tratamiento efectivo. El diagnóstico rápido de ICD puede conducir a una reducción de las estancias hospitalarias y del costo de la atención hospitalaria.

La prueba combinada ToxA + ToxB + GDH de C. difficile (heces) es un inmunoensayo cromatográfico rápido para la detección cualitativa simultánea de toxina A, toxina B y glutamato deshidrogenasa (GDH) de Clostridium difficile en heces humanas. Ofrece un ensayo de detección simple y altamente sensible para hacer un diagnóstico presuntivo de infección por Clostridium difficile.

PRINCIPIO

La prueba combinada C. difficile ToxA + ToxB + GDH (heces) está compuesta por tres tiras reactivas con tres ventanas de prueba: tira reactiva C. difficile Toxin A, tira reactiva C. difficile Toxin B y tira reactiva C. difficile GDH.

Tiras reactivas de toxina A y toxina B de C. difficile: Los anticuerpos antitoxina A y antitoxina B se inmovilizan en las regiones de prueba de las membranas de nitrocelulosa de dos tiras separadas, respectivamente. Se agrega una muestra fecal al tampón diluyente de la muestra que se optimiza para extraer los antígenos de la toxina A y/o B de la muestra. Durante la prueba, los antígenos extraídos, si están presentes, se unirán a los anticuerpos anti-toxina A o anti-toxina B conjugados con partículas coloreadas en la almadilla de muestra de la tira A o B. A medida que la muestra migra a lo largo de la tira por acción capilar e interactúa con los reactivos en la membrana, el complejo será capturado por anticuerpos anti-toxina A o anti-toxina B en la zona de detección de cada tira. El exceso de partículas coloreadas se captura en la zona de control interno.

Tira de prueba de C. difficile GDH: el anticuerpo anti-GDH se inmoviliza en la región de prueba de la membrana de nitrocelulosa. Se agrega una muestra fecal al tampón diluyente de la muestra que se optimiza para extraer los antígenos GDH de la muestra. Durante la prueba, los antígenos expuestos, si están presentes, se unirán al anticuerpo anti-GDH conjugado con partículas coloreadas en la almadilla de muestra. A medida

que la muestra migra a lo largo de la tira por acción capilar, interactúa con los reactivos de la membrana, el anticuerpo anti-GDH capturará el complejo en la zona de detección de la tira. El exceso de partículas coloreadas se captura en la zona de control interno. La presencia de una banda coloreada en la región de prueba indica un resultado positivo para el antígeno en particular, mientras que su ausencia indica un resultado negativo. Una banda de color en la región de control sirve como control del procedimiento, lo que indica que se ha agregado el volumen adecuado de muestra y que la membrana está funcionando.

MATERIALES

Materiales Provistos en el Kit.

- Dispositivo de Prueba en envase individual
- Instructivo de Uso
- Tubo con buffer para diluir la muestra
- Gotarios

Materiales Requeridos pero NO Provistos en el Kit

- Recolector de la Muestra
- Centrífuga
- Reloj o timer
- Guantes desechables

PRECAUCIONES

- Sólo para uso diagnóstico in vitro.
- Lea el prospecto del paquete antes de usar. Las instrucciones deben leerse y seguirse cuidadosamente.
- No use el kit o los componentes más allá de la fecha de vencimiento.
- El dispositivo contiene material de origen animal y debe manipularse como un riesgo biológico potencial. No lo use si la bolsa está dañada o abierta.
- Los dispositivos de prueba se empaquetan en bolsas de aluminio que excluyen la humedad durante el almacenamiento. Inspeccione cada bolsa de aluminio antes de abrirla. No use dispositivos que tengan agujeros en la lámina o donde la bolsa no haya sido completamente sellada. Se pueden producir resultados erróneos si los reactivos o los componentes de la prueba no se almacenan correctamente.
- No utilice el tampón diluyente de muestras si está decolorado o turbio. La decoloración o la turbidez pueden ser un signo de contaminación microbiana.
- Todas las muestras de pacientes deben manipularse y desecharse como si fueran biológicamente peligrosas. Todas las muestras deben mezclarse completamente antes de la prueba para garantizar una muestra representativa antes de la prueba.
- Se debe tener cuidado de almacenar las muestras como se indica en el documento.
- Si las muestras y los reactivos no alcanzan la temperatura ambiente antes de la prueba, la sensibilidad del ensayo puede disminuir. La recolección, el almacenamiento y el transporte de muestras inexactos o inapropiados pueden producir resultados falsos negativos.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Guarde el dispositivo de prueba combinado C. difficile ToxA + ToxB + GDH (heces) a 2~30 °C cuando no esté en uso.
- NO CONGELAR.
- Los componentes del kit son estables hasta las fechas de caducidad marcadas en sus envases y embalajes exteriores.
- Se debe tener cuidado para proteger los componentes del kit de la contaminación. No use si hay evidencia de contaminación microbiana o precipitación. La contaminación biológica de los equipos de dosificación, contenedores o reactivos puede dar lugar a resultados falsos.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

Lleve las pruebas, las muestras, el tampón y/o los controles a temperatura ambiente (15-30 °C) antes de su uso.

1) Recogida de muestras y pre-tratamiento:

- Utilice recipientes para muestras limpios y secos para la recogida de muestras. Se obtendrán mejores resultados si el ensayo se realiza dentro de las 2 horas posteriores a la recolección. Nota: Las muestras recogidas en el contenedor de muestras se pueden almacenar durante 1~2 días a 2~8°C o durante 3 meses a -20°C.

- Para muestras sólidas:** Desensaque y retire el aplicador del tubo de dilución.

Cuide de no derramar o salpicar la solución del tubo. Recolecte muestras insertando el aplicador en al menos 3 sitios diferentes de las heces para recolectar aproximadamente 120 mg de heces (equivalente a 1/4 de un guisante).

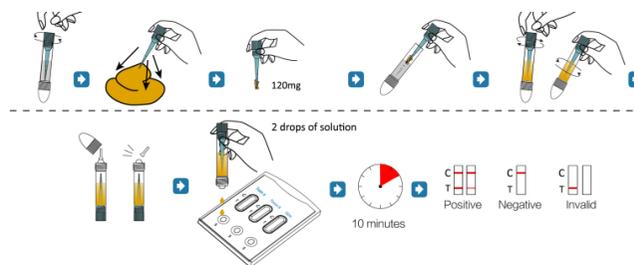
Para muestras líquidas: sostenga la pipeta verticalmente, aspire las muestras fecales y luego transfiera aproximadamente 120 ul de la muestra líquida al tubo de diluyente de muestras.

- Vuelva a colocar el aplicador en el tubo y atornille bien la tapa. Tenga cuidado de no romper la punta del tubo de dilución.
- Agite el tubo de recogida de muestras para mezclar bien la muestra y el tampón diluyente.

2) Desarrollo del Test:

- Retire el dispositivo de prueba de su bolsa sellada y colóquelo sobre una superficie limpia y nivelada. Etiquete la prueba con la identificación del paciente o del control. Para obtener un mejor resultado, el ensayo debe realizarse dentro de las 2 horas.
- Con un trozo de papel de seda, rompa la punta del tubo de dilución. Sostenga el tubo verticalmente y dispense 3 gotas de solución en el pocillo de la muestra (S) del dispositivo de prueba. **Evite atrapar burbujas de aire en el pocillo de la muestra (S) y no deje caer ninguna solución en la ventana de observación.**
- Espere a que aparezcan las bandas de colores. El resultado debe leerse a los 10 minutos.

Nota: Si la muestra no migra (presencia de partículas), centrifugue las muestras contenidas en el tubo de diluyente de muestras. Recoja 120 µL de sobrenadante, dispense en el pocillo de muestra (S) de un nuevo dispositivo de prueba y comience de nuevo siguiendo las instrucciones mencionadas anteriormente.



INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

- POSITIVO:** se observan líneas coloreadas en zona de control (T) y del test (T)
- NEGATIVO:** se observa coloración solamente en zona de control (C)
- INVALIDO:** No se observa color en zona C y T, o aparece color solo en zona T. En estos casos repita el test, y si el problema continúa, contacte a ALATHEIA a soporte@alatheia.cl.

CONTROL DE CALIDAD

- El dispositivo de prueba combinado de C. difficile ToxA + ToxB + GDH (heces) tiene controles (de procedimiento) incorporados. Cada dispositivo de prueba tiene una zona estándar interna para garantizar un flujo de muestra adecuado. El usuario debe confirmar que la banda de color ubicada en la línea "C" está presente antes de leer el resultado.
- Las buenas prácticas de laboratorio sugieren probar controles externos positivos y negativos para garantizar que los reactivos de la prueba funcionen y que la prueba se realice correctamente.

LIMITACIONES DEL TEST

1. El dispositivo de prueba combinado C. difficile ToxA + ToxB + GDH (heces) es para uso profesional de diagnóstico in vitro y solo debe usarse para la detección cualitativa de C. difficile toxina A, toxina B y/o GDH. La intensidad del color en una banda positiva no debe evaluarse como "cuantitativa o semi-cuantitativa".
2. Al igual que con todas las pruebas de diagnóstico, un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una sola prueba, sino que solo debe realizarse el médico después de que se hayan evaluado todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.
3. El incumplimiento del PROCEDIMIENTO DE PRUEBA y la INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS puede afectar negativamente el rendimiento de la prueba y/o invalidar el resultado de la prueba.
4. Los resultados obtenidos con este ensayo, particularmente en el caso de líneas de prueba débiles que son difíciles de interpretar, deben usarse junto con otra información clínica disponible para el médico.

DESEMPEÑO Y CARACTERÍSTICAS

Datos Clínicos:

390 muestras de heces humanas fueron incluidas en una evaluación clínica, con test rápidos comerciales de referencia. Los datos de la comparación se muestran en la siguiente tabla:

C. difficile ToxA + ToxB + GDH Combo	Reference		Total
	Toxin A+	Toxin A-	
Toxin A+	33	0	33
Toxin A-	0	357	357
Total	33	357	390

Relative Sensitivity: >99.9% (89.6%~100.0%)*
Relative Specificity: >99.9% (98.9%~100.0%)*
Overall Agreement: >99.9% (99.0%~100.0%)*
*95% Confidence Interval

C. difficile ToxA + ToxB + GDH Combo	Reference		Total
	Toxin B+	Toxin B-	
Toxin B+	40	0	40
Toxin B-	0	350	350
Total	40	350	390

Relative Sensitivity: >99.9% (91.0%~100.0%)*
Relative Specificity: >99.9% (98.9%~100.0%)*
Overall Agreement: >99.9% (99.0%~100.0%)*
*95% Confidence Interval

C. difficile ToxA + ToxB + GDH Combo	Reference		Total
	GDH+	GDH-	
GDH+	75	0	75
GDH-	0	315	315
Total	75	315	390

Relative Sensitivity: >99.9% (95.1%~100.0%)*
Relative Specificity: >99.9% (98.8%~100.0%)*
Overall Agreement: >99.9% (99.0%~100.0%)*
*95% Confidence Interval

Especificidad Analítica (Reactividad Cruzada)

Los siguientes organismos fueron encontrados negativos al ser analizados con el test C. difficile ToxA + ToxB + GDH Combo (Hece).

<i>Salmonella</i> spp	<i>Campylobacter</i> spp	<i>Escherichia coli</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Norovirus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Shigella</i> spp
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Adenovirus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
<i>Group C Streptococcus</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Group B Streptococcus</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>	

LITERATURE REFERENCES

1. Lyras D., O'Connor J. R., Howard P. M., Sambol S. P., Carter G.P., Phumoonat., Poon R., Adams V., Vedantam G., Johnson S., Gerding D. N., Rood J. I. Toxin B in essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature. 2009 Apr 30; 458 (7242): 1176.
2. Kuehne S. A., Cartman S. T., Heap J. T., Kelly M. L., Cockayne A., Mintn N. P. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature in press Sep. 2010.
3. Hung Y.P., Tsai P.J., Hung K.H., Liu H.C., Lee C.I., et al. (2012) Impact of toxigenic *Clostridium difficile* colonization and infection among hospitalized adults at a district hospital in southern Taiwan.
4. Carman R.J., Wickham K.N., Chen L., et al. Glutamate Dehydrogenase Is Highly Conserved among *Clostridium difficile* Ribotypes. Journal of Clinical Microbiology. 2012;50 (4):1425-1426. doi:10.1128/JCM.05600-11.

GLOSARIO DE SIMBOLOS

r	Catalog number	0	Temperature limitation
i	Consult instructions for use	L	Batch code
l	In vitro diagnostic medical device	e	Use by
m	Manufacturer	T	Contains sufficient for <n> tests
s	Do not reuse	A	Authorized representative in the European Community
U	CE marking according to IVD Medical Devices Directive 98/79/EC		

Distribuidor Exclusivo para Chile:



Avenida del Valle Norte 945, Oficina 5610
Huechuraba, Santiago, Chile
TEL: +56 22 343 5122
info@alatheia.cl
www.alatheia.cl

Fabricado por:



Assure Tech. (Hangzhou) Co., Ltd.
Building 4, No. 1418-50, Moganshan Road,
Gongshu District, Hangzhou,
310011 Zhejiang, P.R. China

Lotus NL B.V.
Koningin Julianaplein 10, le Verd,
2595AA, The Hague, Netherlands

