VITASSAY

Clostridium difficile GDH+Toxin A+B

Test rápido de detección cualitativa simultánea de Clostridium difficile Glutamato Deshidrogenasa (GDH), Toxina A y Toxina B en muestras de heces humanas.

IU-7715024 Ed01 Diciembre 2016

CE IVD ES

Vitassay

Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.

USO PREVISTO

Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B es un test rápido, inmunocromatográfico, de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de Clostridium difficile Glutamato Deshidrogenasa (GDH), Toxina A y Toxina B en muestras de heces humanas.

Ensayo sencillo, no invasivo y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de infección causada por Clostridium difficile.

INTRODUCCIÓN

Clostridium difficile es una bacteria anaerobia Gram-positiva, formadora de esporas que causa un espectro de antibióticos asociados con colitis a través de la elaboración de dos toxinas y de otros factores virulentos.

Clostridium difficile causa un rango de síntomas que van desde diarrea moderada a severa, siendo el agente etiológico de la colitis pseudomembranosa.

PRINCIPIO

Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para hacer un diagnóstico presuntivo de infección por Clostridium difficile.

Tira A: En la zona de la línea del test de la membrana se han fijado unos anticuerpos monoclonales frente a GDH.

Tira B: En la zona de la línea del test de la membrana se han fijado unos anticuerpos monoclonales frente Toxina A de Clostridium difficile.

Tira C: En la zona de la línea del test de la membrana se han fijado unos anticuerpos monoclonales frente a Toxin B de Clostridium difficile.

Durante el proceso, la muestra reacciona con los anticuerpos frente a GDH (tira A), Toxina A (tira B), y/o Toxina B (tira C) formando conjugados. La mezcla se mueve hacia la parte de arriba de la membrana por acción capilar. Si la muestra es GDH positiva, los anticuerpos presentes en la membrana (línea de test) reaccionarán con la mezcla de conjugado y aparecerán una línea coloreada roja en la tira A. Si la muestra es Toxina A positiva, los anticuerpos presentes en la membrana (línea de test) reaccionarán con la mezcla de conjugado y aparecerán una línea coloreada roja en la tira B. Si la muestra es Toxina B positiva, los anticuerpos presentes en la membrana (línea de test) reaccionarán con la mezcla de conjugado y aparecerán una línea coloreada roja en la tira C. Aunque la muestra sea positiva o negativa, la mezcla continua moviéndose a través de la membrana y la línea verde de control siempre aparecerá.

La presencia de estas líneas verdes (en la zona de control (C)) indica que el volumen añadido es suficiente, que el flujo ha sido el adecuado y también sirve como control interno de los reactivos.

PRECAUCIONES

- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- No utilizar el test si el envase primario se encuentra dañado.
- Las muestras deben considerarse potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Para evitar errores de contaminación, un nuevo test deberá utilizarse para la evaluación de cada muestra. Dispositivos de un solo uso.
- Los tests tras su utilización deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con **Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B.** No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

El producto debe ser almacenado en el rango de temperatura ambiente o refrigerado (2-30ºC/35.6-86ºF) en su envase original sellado.

El producto es estable hasta la fecha de caducidad impresa en el envase.

No debe abrirse hasta el momento de su uso.

No congelar.

MATERIALES

MATERIAL SUMINISTRADO	MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADOS
▪ **10** tests/kit **Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B** ▪ Instrucciones de uso. ▪ **10** viales con diluyente para dilución de muestra.	▪ Recipiente para recogida de muestras. ▪ Guantes desechables. ▪ Cronómetro. ▪ Espátula.

Vitassay
Parque Tecnológico WALQA
Ctra. N.330, Km.566
22197-Cuarte (Huesca, SPAIN)
www.vitassay.com

RECOGIDA DE MUESTRAS

La cantidad de heces tomada debe ser suficiente: 1-2g o mL si la muestra es líquida. Las muestras deben ser almacenadas en un envase limpio y seco.

Las muestras pueden conservarse refrigeradas (2-8ºC/35.6-46.4ºF) durante 1-2 dias antes de su uso. Si queremos conservar la muestra por un periodo prolongado, máximo 1 año, debe congelarse a -20ºC (-4ºF). En este caso, la muestra debe ser totalmente descongelada alcanzando la temperatura ambiente antes de usarse.

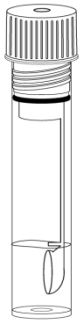
Homogeneizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1 Abrir el tapón del vial con diluyente para dilución de muestra (figura 1) y usar la cuchara para tomar suficiene cantidad de muestra. Para muestras sólidas, insertar la cuchara en 4 puntos distintos de la muestra de heces (figura 2), quitar el exceso de muestra con la espátula (figura 3), y meter la muestra en el vial para dilución de muestra (figura 4). Para muestras líquidas tomar una cuchara llena de muestra (figura 3) e introducirla en el vial para dilución de muestra.

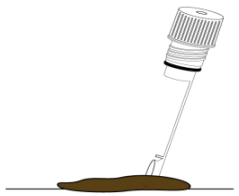
2. Cerrar el vial para dilución de muestra y agitar lo para diluir la muestra con el diluyente (figura 4).

1



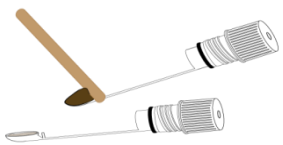
Vial para dilución de muestra

2



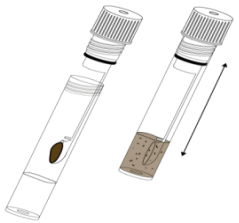
Insertar la cuchara en 4 zonas distintas de la muestra.

3



Eliminar el exceso de muestra con la espátua. Muestras líquidas: cuchara llena.

4



Poner la muestra en el vial, cerrar el tapón y agitar.

PROCEDIMIENTO

Antes de realizar la prueba los test, muestras, controles y diluyente deben alcanzar temperatura ambiente (15-30ºC/59-86ºF). No abrir el envase hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el vial con la muestra para asegurar una buena dispersión.

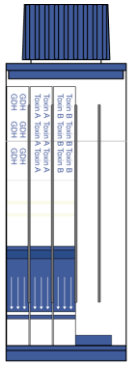
2. Sacar **Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B** de su envase antes de utilizarlo (figura 5).

3. Tomar el vial para dilución conteniendo la muestra diluida (figura 6), colocarlo dentro del tubo multiplex (figura 7). Enroscar el tapón del tubo multiplex (figura 8). La parte de abajo del vial para dilución de muestra se romperá y la solución diluyente+muestra alcanza la zona de muestra de las tiras (figura 9)

4. Dejar el tubo multiplex verticalmente en una superficie plana y leer el resultado a los **10 minutos**. No leer el resultado después de 10 minutos.

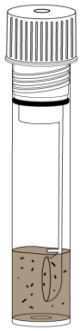
Si no se observa el avance de la cromatografía debido a la presencia de partículas sólidas (muestra no está homogeneizada), el proceso de migración puede detenerse en una o más tiras. En este caso, golpear la parte final del tubo mutiplex en una superficie dura para permitir que la migración comience de nuevo.

5



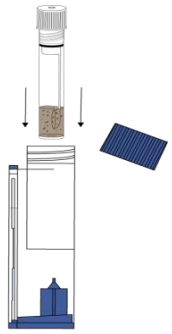
Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B

6



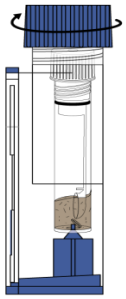
Vial con muestra diluida dentro

7



Introduce el vial con la muestra diluida dentro del mutiplex.

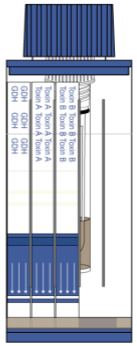
8



Cierra el tapón y la parte final del vial ser romperá

Vitassay
Parque Tecnológico WALQA
Ctra. N.330, Km.566
22197-Cuarte (Huesca, SPAIN)
www.vitassay.com

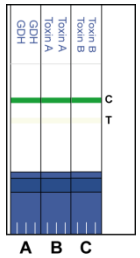
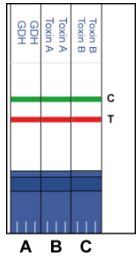
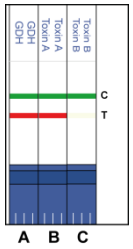
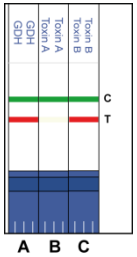
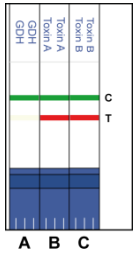
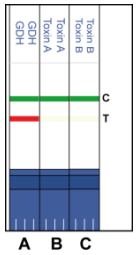
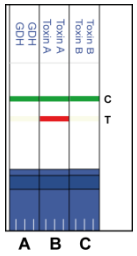
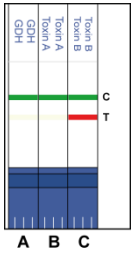
9



Se produce la reacción. **Leer el resultado a los 10 minutos.**

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Tira A: GDH, Tira B: Toxin A, Tira C: Toxin B

	**NEGATIVO** Solo una linea verde en la zona de control (C) en las cuatro tiras (A, B y C).	No hay presencia de GDH, Toxina A y Toxina B.
	**POSITIVO** Además de la línea verde (línea de control C), una línea roja aparece en cada tira, línea de test (T).	Hay presencia de GDH, Toxina A, y Toxina B.
	**NEGATIVO** Tira C (Toxina B)→ línea verde. **POSITIVO** Tira A (GDH)→ líneas verde/roja. Tira B (Toxina A)→ líneas verde/roja.	Hay presencia de GDH y Toxina A. Infección causada por Clostridium difficile.
	**NEGATIVO** Tira B (Toxina A)→ línea verde. **POSITIVO** Tira A (GDH)→ líneas verde/roja. Tira C (Toxina B)→ líneas verde/roja.	Hay presencia de GDH y Toxina B. Infección causada por Clostridium difficile.
	**NEGATIVO** Tira A (GDH)→ línea verde. **POSITIVO** Tira B (Toxina A)→ líneas verde/roja. Tira C (Toxina B)→ líneas verde/roja.	Hay presencia de Toxina A y Toxina B. Infección causada por Clostridium difficile. Si estos resultados aparecen, se debe repetir el test con una muestra fresca. Si los resultados siguen siendo positivos para Toxina A and B y negativos para GDH, la muestra debe ser considerada como positiva para la Toxina A y B.
	**NEGATIVO** Tira B (Toxina A)→ línea verde. Tira C (Toxina B)→ línea verde. **POSITIVO** Tira A (GDH)→ líneas verde/roja.	Hay presencia de GDH. Infección causada por Clostridium difficile.
	**NEGATIVO** Tira A (GDH)→ línea verde. Tira C (Toxina B)→ línea verde. **POSITIVO** Tira B (Toxin A)→ líneas verde/roja.	Hay presencia de Toxina A. Infección causada por Clostridium difficile. Si estos resultados aparecen, se debe repetir el test con una muestra fresca. Si los resultados siguen siendo positivos para Toxina A y negativos para GDH, la muestra debe ser considerada como positiva para la Toxina A.
	**NEGATIVO** Tira A (GDH)→ línea verde. Tira B (Toxina A)→ línea verde. **POSITIVO** Tira C (Toxina B)→ líneas verde/roja.	Hay presencia de Toxina B. Infección causada por Clostridium difficile. Si estos resultados aparecen, se debe repetir el test con una muestra fresca. Si los resultados siguen siendo positivos para Toxina B y negativos para GDH, la muestra debe ser considerada como positiva para la Toxina B.
Cualquier otro resultado	Resultado inválido en A, B o C se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.	

Existe la posibilidad de que un porcentaje muy bajo de muestras resulte negativo para GDH y positivo para toxinas.

Notas: La intensidad de la línea roja de test en la región de la línea de resultados (T) variará dependiendo de la concentración de antígeno en la muestra.

Los resultados positivos detallados en la tabla anterior deberían ser confirmados con procedimientos de diagnóstico adicionales.

Resultados inválidos: Ausencia total de las líneas de control (verdes) indica un resultado inválido, independientemente de la aparición o no de las líneas de tet (rojas). procedimiento inadecuado, deterioro de reactivos, o volumen insuficiente de muestra podrían ser la causa del resultado inválido. Revisar el procedimiento y repetir el ensayo con un nuevo test. Si el problema continua, dejar de utilizar el kit y contactar con su distribuidor.

CONTROL DE CALIDAD

Existe un control interno del procedimiento incluido en **Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B**. Las líneas verdes aparecen en la ventana de resultados como control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

- No debe utilizarse **Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B** una vez abierto y transcurridas 2 horas.
- Un exceso de muestra puede dar resultados erróneos (aparición de líneas de color pardo). Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
- La intensidad de las línea de test variará dependiendo de la concentración de antígenos.
- No ha sido determinado el uso del test en muestras diferentes a las humanas.

Vitassay
Parque Tecnológico WALQA
Ctra. N.330, Km.566
22197-Cuarte (Huesca, SPAIN)
www.vitassay.com

- La calidad de **Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B** depende de la calidad de la muestra, por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras.
- Los resultados positivos determinan la presencia de GDH, Toxina A y Toxina B en muestras fecales. Un resultado positivo debería ser confirmado con otras técnicas de laboratorio adicionales (cultivo toxigénico) para determinar la cepa. La confirmación de una infección debería solamente ser hecha por un médico tras la evaluación de todos los hallazgos clínicos y de laboratorio y deben estar basados en la correlación entre los resultados y más observaciones clínicas.
- Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de antígenos en la muestra de heces sea inferior al límite de detección. Si los síntomas o la situación persisten, para la determinación de Clostridium difficile se debería repetir la prueba con la muestra sometida a enriquecimiento.

VALORES ESPERADOS

Clostridium difficile está asociado con el 95-100% de los casos de colitis pseudomembranosa, con el 60-75% de los casos de colitis asociada a antibióticos y con el 35% de los casos de diarrea asociada a antibióticos. Las otras causas de diarrea asociada a antibióticos se desconocen.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad y especificidad clínica (GDH)

Una evaluación fue desarrollada comparando los resultados obtenidos por **Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B** con los de otro test comercial (C.DIFF QUIK CHEK Complete®, Techlab).

Las muestras fueron tomadas directamente de pacientes con diarrea.

Muestras positivas fueron confirmadas con un ensayo ELISA.

Los resultados se muestran a continuación:

		C. DIFF QUIK CHEK Complete®		
		Positivo	Negativo	Total
Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B GDH	Positivo	26	0	26
	Negativo	0	48	48
	Total	26	48	74

Vitassay Clostridium difficile GDH + Toxin A + Toxin B (GDH) vs C. DIFF QUIK CHEK Complete®			
Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
>99%	>99%	>99%	>99%

Otra evaluación se realizó usando muestras positivas y negativas y comparando los resultados de **Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B** con un ELISA (Wampole™ C. Diff Chek™-60, Techlab).

Los resultados se muestran a continuación:

		Wampole™ C. Diff Chek™-60		
		Positivo	Negativo	Total
Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B GDH	Positivo	39	0	39
	Negativo	2	47	49
	Total	41	47	88

Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B (GDH) vs Wampole™ C. Diff Chek™-60			
Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
>95%	>99%	>99%	96%

Sensibilidad y especificidad clínica (Toxina A+B)

Se realizó una evaluación comparando dos test inmunocromatográficos para detectar Toxina A y Toxina B de Clostridium difficile, **Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A +B** y C. DIFF QUIK CHEK Complete®, Techlab.

Las muestras fueron tomadas directamente de pacientes con diarrea.

Muestras positivas fueron confirmadas con un ensayo ELISA.

Los resultados se muestran a continuación:

		C. DIFF QUIK CHEK Complete®		
		Positivo	Negativo	Total
Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B Toxina A+B	Positivo	6	0	6
	Negativo	0	44	44
	Total	6	44	50

Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B (Toxin A+B) vs C. DIFF QUIK CHEK Complete®			
Sensibilidad	Especificidad	PPV	VPN
>99%	>99%	>99%	>99%

Los resultados mostraron que **Vitassay Clostridium difficile GDH+Toxin A+B** presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar Clostridium difficile glutamato deshidrogenasa (GDH), Toxina A y Toxina B.

Reacciones cruzadas

No se detectaron reacciones cruzadas con los siguientes patógenos gastrointestinales ocasionalmente presentes en las heces:

Campylobacter coli	*Salmonella enteritidis*	*Shigella dysenteriae*
Campylobacter jejuni	*Salmonella paratyphi*	*Shigella flexneri*
E. coli O157: H7	*Salmonella typhi*	*Shigella sonnei*
H. pylori	*Salmonella typhimurium*	*Staphylococcus aureus*
Listeria monocytogenes	*Shigella boydii*	*Yersinia enterocolitica*

BIBLIOGRAFÍA

1. KAREN C. CARROLL and JOHN G. BARLETT. "Biology of Clostridium difficile: Implications for Epidemiology and Diagnosis". Annual Review of Microbiology. Vol. 65. Oct. 2011. Pp. 501-521.

2. KERRIE EASTWOOD, PATRICK ELSE, ANDRÉ CHARLETT and MARIA WILCOX. "Comparison of nine commercially available Clostridium difficile toxin detection assays, a real-time PCR assay for C. difficile tcdB, and a Glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods". Journal of Clinical Microbiology. Vol.47, Nº. 10, Oct. 2009, p. 3211-3217.

3. M. W. D. WREN, M. SIVAPALAN, R. KINSON and N. P. SHETTY. "Laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection. An evaluation of test for faecal toxin, glutamate dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory". British Journal of Biomedical Science. Vol. 66 (1), 2009 pp. 1-5.

SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

IVD	Producto para diagnóstico *in vitro*		Almacenar en lugar seco
	Consultar las instrucciones de uso		Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad		Fabricante
LOT	Número de lote	Σ n	Contiene <n> test
DIL	Diluyente de muestra	REF	Número de referencia