

CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXIN A+B CARD PLUS

Per uso diagnostico *in Vitro*

Test rapido immunocromatografico per la determinazione diretta sulle feci della tossina A e della tossina B di Clostridium difficile, comprensivo dei controlli

I. DESTINAZIONE D'USO

Clostridium Difficile Toxin A+B Card è un test rapido immunocromatografico per la determinazione qualitativa diretta della Tossina A e della Tossina B di Clostridium difficile nelle feci.

II. INTRODUZIONE

Il Clostridium difficile è un bacillo anaerobio, gram-positivo, che produce spore. E' il principale agente eziologico della diarrea e della colite associate agli antibiotici. E' la causa più comune di diarrea associate alle cure nei paesi sviluppati ed è la più importante fonte di morbilità e di mortalità a livello nosocomiale. La malattia a carico di C. difficile si sviluppa quando il batterio riesce a proliferare nel colon, per esempio dopo assunzione di antibiotici che eliminano la flora batterica in competizione.

C. difficile può rilasciare due tossine ad alto peso molecolare, tossina A e B, che sono le responsabili delle manifestazioni cliniche che possono andare da lievi, diarrea acquosa autolimitante fino a coliti pseudomembranose fulminanti, megacolon tossico e morte.

La tecnica gold standard per la determinazione qualitativa diretta della Tossina A e della Tossina B è la coltura tossigenica. Coltura ed isolamento di C. difficile nelle feci, seguita da test della tossina sull'isolato, tecnica laboriosa e indaginosa.

III. PRINCIPIO DEL METODO

La card è costituita da 2 stick differenti per la determinazione della Tossina A o della Tossina B di C. difficile. Al termine della membrana è posizionato l'anticorpo monoclonale anti -Tossina A o anti-Tossina B, coniugato con latex. Il campione, aggiunto in ciascun pozzetto della card, migra lungo la membrana e l'eventuale presenza dell'antigene determina un legame con gli anticorpi monoclonali. Questo complesso reagisce con gli anticorpi monoclonali anti-Tossina A o anti-Tossina B nella zona di reazione producendo una banda di colore rosso. In assenza dell'antigene specifico non comparirà alcuna banda; il campione continua la migrazione lungo la membrana fino alla zona di controllo dove da luogo ad una banda verde, la cui apparizione dimostra il corretto funzionamento dei test.

IV. REATTIVI E MATERIALI FORNITI CON IL KIT

Il kit contiene tutti i materiali necessari per eseguire 25 determinazioni:

25 card per la reazione immunocromatografica,

25 flaconi con 1,0 mL di soluzione d'estrazione

10 gocciolatori

Set di controlli: **Controllo Positivo (1 x 0,5 mL):** N.1 vial con gocciolatore contenente componenti non-infettivi e NaN₃ come conservante
Controllo Negativo: usare Diluente-Tampone di estrazione (soluzione d'estrazione)

1 Foglio istruzioni

Conservare il kit ad una temperatura compresa tra 2 e 30°C.

Non congelare. Il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

V. PRECAUZIONI

- Il kit è solo per uso diagnostico in vitro
- Il kit è destinato ad un uso professionale in laboratorio ed il test deve essere eseguito da personale tecnico con adeguato addestramento. Non è utilizzabile a domicilio dal paziente.
- Leggere le istruzioni contenute nel kit prima di procedere all'esecuzione della prova.
- Non usare il kit dopo la data di scadenza.
- Tutti i reattivi ed i materiali venuti a contatto con campioni potenzialmente infetti devono essere disinfettati o autoclavati a 121°C per almeno 1 ora.
- Indossare guanti e mascherina protettiva quando si esegue la prova. Non mangiare, non bere e non fumare nell'area dove si esegue la prova. Evitare ogni tipo di contatto tra mani e occhi o naso durante la manipolazione del campione e l'esecuzione della prova.
- Non utilizzare le card se la busta risulta danneggiata o aperta.

VI. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Raccogliere le feci appena possibile dopo l'apparizione della sintomatologia specifica. Non utilizzare conservanti o altro materiale estraneo come siero animale, detersivi che possono interferire con il test.

Se non fosse possibile eseguire immediatamente il test, conservare le feci diluite a 4-8°C per non più di 3 giorni o le feci non diluite a -20°C per tempi più lunghi.

Scrivere il nome del paziente sul flacone contenente la soluzione d'estrazione contenuta nel kit.

Aprire il flacone contenente il liquido di estrazione svitando il tappo. Immergere in 3 punti diversi delle feci raccolte il segmento del tappo con l'estremità zigrinata. Estrarre l'estremità zigrinata dalle feci, e verificare di aver raccolto una piccola parte (125 mg circa) delle feci stesse. Riposizionare il tappo sul flacone del liquido di estrazione, così che l'estremità zigrinata si immerga nel liquido stesso. Agitare delicatamente fino ad ottenere una sospensione omogenea. Attendere almeno 3 minuti, per consentire al campione di omogenarsi e alle parti solide di depositarsi sul fondo del flacone. Eventualmente ripetere l'operazione fino ad ottenere una soluzione di colore giallo scuro-marrone.

Il trasferimento di una quantità di feci troppo piccola, o la completa mancanza di miscelazione e sospensione delle feci nel liquido di estrazione del campione può causare risultati del test falsamente negativi. Prima del test, miscelare completamente il campione su vortex.

L'aggiunta di una quantità eccessiva di campione può causare risultati non validi dovuti al flusso limitato del campione.

Campioni liquidi o semi-solidi: Usare una pipetta (inclusa nel kit) per ciascun campione. Dispensare 4-6 gocce di campione (125µL) in un tubo di estrazione. Miscelare su vortex per 15 secondi.

VII. PROCEDIMENTO

Prelevare il campione

Miscelare il campione con il tampone e rompere il tappo

Gocciolare 4 gocce di miscela "campione + tampone"

1. Portare i reattivi a temperatura ambiente. Estrarre la card dalla busta e contrassegnarla con i dati del paziente.

2. Agitare delicatamente il flacone contenente il campione.







3. Rompere il beccuccio del flacone di estrazione e dispensare 3-4 gocce di campione (100 µL) nelle finestre circolari della card.

4. Attendere 10 minuti, quindi osservare la comparsa di bande colorate

Procedimento per controlli

Aggiungere il volume richiesto 3-4 gocce (100µL) di **Controllo Positivo/Negativo** nel pozzetto campione, leggere i risultati dopo 10 minuti.

VIII. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1.		Toxin A and Toxin B of <i>Clostridium difficile</i> negativi.
2.		Toxin A and Toxin B of <i>Clostridium difficile</i> positivi.
3.		Toxin A of <i>Clostridium difficile</i> positivo. Toxin B of <i>Clostridium difficile</i> negativo.
4.		Toxin A of <i>Clostridium difficile</i> negativo. Toxin B of <i>Clostridium difficile</i> positivo.

Test non valido: quando non appare alcuna banda.

IX. CONTROLLO QUALITA' INTERNO

Viene inclusa la procedura di Controllo Qualità interno. Una linea verde compare nella regione controllo C è un controllo interno. Conferma che il volume del campione è sufficiente e la tecnica procedurale corretta.

X. CARATTERISTICHE VALIDAZIONE DEL TEST

Valori attesi: *Clostridium difficile* è associato al 95-100% dei casi di colite pseudomembranosa, 60-75% dei casi di colite da antibiotici e il 35% dei casi di casi di diarrea da antibiotici.

C. Difficile Tox A – Sensibilità Analitica: Le performance del test sono state valutate usando soluzioni diluite di Tossina A purificata. Il sistema è in grado di determinare la concentrazione di 2 ng/mL di Tossina A.

C. Difficile Tox B – Sensibilità Analitica: Le performance del test sono state valutate usando soluzioni diluite di Tossina B purificata. Il sistema è in grado di determinare la concentrazione di 0.63 ng/mL.

C. Difficile Tox A+B – Cross reattività: Per determinare la specificità del test è stata impiegata la Tossina A purificata. C. Difficile Toxin B mostra risultati negativi per la Tossina A fino a 500 ng/mL. *Clostridium Difficile* Toxin A mostra risultati negativi per la Tossina B fino a 500 ng/mL.

E' stata valutata la cross-reattività di C. Difficile Toxin A+B CARD. Non c'è cross-reazione con i comuni patogeni intestinali, altri organismi e patogeni occasionalmente presenti nelle feci: *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, *E.ColiO157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia spp* and *Yersinia enterocolitica*













C. Difficile Tox A+B – Sensibilità e Specificità diagnostica: E' stato condotto uno studio su campioni con *Clostridium Difficile* Toxin A+B avendo come confronto il test C. DIFF. QUICK CHECK Complete® Techlab riferimento il metodo delle colture cellulari. La sensibilità del metodo è risultata del 99%. La specificità è risultata del 99%. PPV >99%; NPV >99%.

XI. LIMITI DEL TEST

- *Clostridium Difficile* Toxin A+B Card è un test di screening per determinare la presenza della tossina A o della tossina B di *Clostridium difficile* nelle feci. Una diagnosi definitiva deve essere confortata da altri parametri clinici.
- Un risultato negativo non esclude generalmente la presenza di un'infezione da *Clostridium difficile*. Questo può essere causato dalla digestione delle tossine da parte di enzimi proteolitici fecali a causa di una conservazione impropria del campione. Se vi è il ragionevole sospetto di una infezione da *Clostridium difficile* testare un altro campione.
- La presenza di un quantitativo significativo di sangue nelle feci può indurre, in un numero limitato di casi, a dei falsi positivi.
- Un risultato positivo non esclude la presenza di altri patogeni.
- Il colore delle bande può cambiare leggermente in funzione dell'aspetto del campione. Sono state segnalate bande verde scuro (invece che rosso) nell'esame di feci scure o verdastre. Questo colore delle feci appare nei pazienti in trattamento con ferro fumarato per la terapia delle deficienze di ferro. Interpretare i risultati nel modo solito: test positivo in presenza di 2 bande, test negativo in presenza di una sola banda.
- Il test deve essere fatto entro due ore dall'apertura della busta con card

XII. BIBLIOGRAFIA

- 1 Wren M.W.D, et al. "Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory". British Journal of Biomedical Science, 66 (1), 2009
- 2 Vaishnmavi, Ch., "Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases". Indican J. Med. Res. 131, April 2010, pp 487-499

	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Limiti di temperatura		Codice del lotto (EXXX)		Fabbricante		Mantenere asciutto		Non sterile
	Consultare le istruzioni per l'uso		Utilizzare entro (anno/mese)		Numero di catalogo		Non riutilizzare		Fragile, maneggiare con cura		Tenere lontano dal calore

CONFEZIONE

Card per la reazione immunocromatografica
 Gocciolatori
 Soluzione d'estrazione
 Controllo positivo
 Istruzioni d'uso

Ref. VC 194055P

25 pz
 10 pz
 25 x 1 mL
 1 x 0,5 mL
 1 pz

Codice Ramo CND W0105011702

