

CLOSTRIDIUM DIFFICILE GDH PLUS

Per uso diagnostico *in Vitro*Test immunocromatografico rapido per la determinazione qualitativa dell'antigene comune *Clostridium difficile* GDH nelle feci umane

I. INTRODUZIONE E DESTINAZIONE D'USO

CLOSTRIDIUM DIFFICILE GDH kit è un test rapido qualitativo per la determinazione di *Clostridium difficile* nelle feci di pazienti con diarrea, che rileva l'enzima Glutammato Deidrogenasi prodotto da tutti i ceppi di *C. difficile* (antigene GDH). Il test è quindi uno strumento di screening utile nella diagnosi di infezione da *C. difficile*.

Il *Clostridium difficile* è un bacillo anaerobio, gram-positivo, che produce spore. La sua caratteristica è quella di sopravvivere per molto tempo nei pazienti e negli ambienti così da favorirne la diffusione e la formazione di spore. Esso viene trasmesso per via oro-fecale.

Il *Clostridium difficile* è il principale patogeno di diarree associate ad antibiotici e/o a coliti pseudomembranose in pazienti ospedalizzati. Normalmente la flora intestinale di un adulto sano è resistente alla colonizzazione da *Clostridium difficile*. Tuttavia se la normale flora batterica viene alterata, verrà anche persa la resistenza alla colonizzazione. Ogni fattore associato all'alterazione della normale flora enterica aumenta il rischio di colonizzazione da *Clostridium difficile* dopo l'assunzione di antibiotici, specialmente quelli ad ampio spettro come penicilline, cefalosporine e clindamicina.

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.

L'enzima Glutammato Deidrogenasi viene prodotto in grande quantità da tutti i ceppi di *C. difficile*, sia tossigenici che non tossigenici, così da risultare un marker eccellente per l'identificazione del microrganismo.

II. PRINCIPIO DEL TEST

CLOSTRIDIUM DIFFICILE GDH è un test immunocromatografico a flusso laterale qualitativo per la determinazione dell'antigene GDH in campioni fecali. La membrana è pretrattata, nella zona test, con anticorpi monoclonali specifici anti-GDH. Durante il test, il GDH eventualmente presente nel campione fecale reagisce con il coniugato colorato preadsorbito sul gold pad (anticorpi anti-GDH/microsfere colorate). La miscela si muove lungo la membrana per azione capillare. Gli anticorpi specifici presenti sulla membrana reagiscono con il coniugato formando una banda colorata (T). Il campione continua la migrazione lungo la membrana filtrante fino alla zona di controllo, dove è legato anche un anticorpo generico capace di legare l'anticorpo marcato con le microsfere colorate, dando luogo ad una banda colorata che serve come controllo interno per il corretto funzionamento dei reattivi e per l'adeguato volume di campione usato (C).

III. REAGENTI E MATERIALI Ogni kit contiene:

C. difficile GDH card (25 card): Le card sono in una busta sigillata contenente una bustina di essicante.

Diluente – Tampone di estrazione (25x1.0 mL tubi LIQ.EXTR): soluzione salina contenente conservante e proteine.

Set di controlli: **Controllo Positivo (1 x 0.5 mL):** N.1 vial con gocciolatore contenente componenti non-infettivi e NaN_3 come conservante

Controllo Negativo: usare Diluente-Tampone di estrazione (soluzione d'estrazione)

Istruzioni per l'uso (1).

Materiali necessari (non forniti)

Dispositivi per la raccolta dei campioni; Guanti monouso; Pipette gocciolatrici; Cronometro.

IV. PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *in vitro* e per solo uso professionale.
- Non utilizzare il kit oltre la data di scadenza, reagenti provenienti da altri lotti
- Seguire le istruzioni per l'uso scrupolosamente.
- Il test è da considerarsi monouso. Non riutilizzare la card per altri test.
- Il test deve rimanere nella confezione sigillata fino al momento dell'uso.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio, indossare indumenti protettivi e guanti monouso, non mangiare bere o fumare nell'area di lavoro.
- Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi e manipolati nello stesso modo di agenti infettivi.
- Il test deve essere eliminato in apposito contenitore in accordo alle Norme vigenti.

V. STOCCAGGIO E STABILITÀ

Conservare il dispositivo sigillato sia refrigerato che a temperatura ambiente (2-30°C/36-86°F). Il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Il dispositivo deve restare sigillato fino al momento dell'uso. Non congelare.

VI. RACCOLTA CAMPIONI E PREPARAZIONE

Raccogliere una quantità adeguata di feci sufficiente (1-2 gr o ml per campioni liquidi). I campioni di feci devono essere raccolti in contenitori asciutti e puliti (preferibilmente nessun conservante, nessun terreno di trasporto). I campioni possono essere conservati in frigorifero (2-8°C) fino a 7 giorni dopo la raccolta. Per periodi più lunghi, i campioni devono essere conservati a $\leq -20^\circ\text{C}$. Non congelare e scongelare ripetutamente i campioni, in quanto ciò potrebbe portare a risultati errati. I campioni conservati in frigorifero devono essere lasciati a temperatura ambiente prima dell'uso. I campioni congelati devono essere completamente scongelati e miscelati prima del loro utilizzo.

VII. PROCEDURA

Rivedere istruzioni "di raccolta dei campioni". Non aprire gli involucri fino al momento di eseguire il test. Assicurarsi che tutti i reagenti siano a temperatura ambiente prima di iniziare il dosaggio.

Procedimento del campione

Usare materiale distinto per ogni campione. Aprire il flacone contenente il tampone di estrazione (1 mL) 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, pari a un chicco di riso (150-250 mg) delle feci stesse. Riposizionare il tappo sul flacone del tampone di estrazione, così che l'estremità zigrinata si immerga nel liquido stesso. Agitare delicatamente fino ad ottenere una sospensione omogenea. Per **feci liquide** o semi-solidi usare una pipetta di trasferimento, prelevando una quantità di feci dal campione stesso. Dispensare 250µl del campione fecale nel flacone di liquido di estrazione del campione. Agitare delicatamente, quindi agitare su vortex per 15 secondi.

Procedimento del test

Portare i reattivi e il campione a temperatura ambiente prima di effettuare il test.

1. Estrarre la card dalla busta ed usare il prima possibile.
2. Usare materiale pulito per ciascun campione.
3. Rompere il tappo del tubo di estrazione.
4. Dispensare 4 gocce di campione (100 µL) nella finestra circolare della card. Far partire il cronometro.
5. Attendere 10 minuti quindi osservare la comparsa di bande colorate nelle finestre contrassegnate con "T" e "C".

Procedimento per i controlli

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

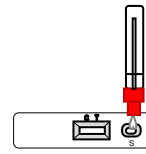
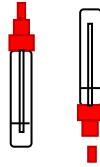
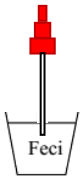


Illustrazione 1

Illustrazione 2

Raccolta campione

Miscelare il campione con il tampone e rompere il tappo



Aggiungere 4 gocce della miscela tampone-campione

VIII. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

POSITIVO:

Compaiono due linee nella finestra centrale, nella zona del risultato (linea del test rosso indicato nella figura con la lettera T) e nella zona di controllo (linea di controllo verde segnata nella figura con la lettera C). Il campione è positivo per C.difficile GDH. Vedi illustrazione 3

NEGATIVO:

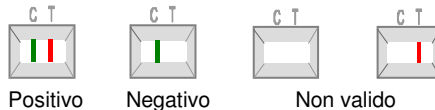
Solo una banda verde appare nella zona di controllo segnata in figura con la lettera C (linea di controllo).

INVALIDO:

Totale assenza della banda di controllo verde indipendentemente dalla presenza della banda rossa; il volume di campione insufficiente, la procedura non corretta o un deterioramento dei reagenti sono le cause più probabili della mancata comparsa della banda di controllo. Rivedere la procedura e ripetere il test con una nuova card. Se il problema persiste, non utilizzare il kit e contattare il distributore locale.

L'intensità della banda di colore rosso nella zona del risultato varia a seconda della concentrazione di antigeni presenti nel campione. Tuttavia, né un valore quantitativo né l'incremento di antigeni può essere determinato con questo test qualitativo. I controlli interni procedurali sono inclusi nel test: una banda verde che compare nella zona di controllo (C) conferma che il volume di campione è sufficiente e la procedura corretta.

Illustrazione 3



Positivo

Negativo

Non valido

IX. CARATTERISTICHE DEL TEST

A) Valori attesi

Clostridium difficile è associato con 95-100% dei casi di colite pseudomembranosa, 60-75% dei casi di colite da antibiotici e 35% dei casi di diarrea da antibiotici.

B) Sensibilità e specificità

Alcuni campioni di feci di pazienti con diarrea sono stati valutati. I risultati ottenuti con il CLOSTRIDIUM DIFFICILE GDH in confronto con altri test immunologici presenti in commercio (test IC: C.DIFF QUICK CHEK Complete TechLab) hanno mostrato: Sensibilità clinica >99% e una specificità clinica >99%. PPV >99%; NPV >99%. Sensibilità analitica: 0.8 ng/mL.

C) Cross-reazione

E' stata eseguita una valutazione per determinare eventuali reazioni crociate per il test CLOSTRIDIUM DIFFICILE GDH. Non è stata osservata alcuna reazione crociata con i microrganismi gastrointestinali più comunemente presenti nelle feci: Campylobacter, Helicobacter pylori, Salmonella spp, E.coli spp, Shigella spp ed Yersinia spp.

X. CONTROLLO QUALITA' INTERNO

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

Buona pratica di laboratorio comprende l'uso di controllo esterno per garantire il corretto funzionamento del kit. In ogni seduta analitica (o secondo le procedure di controllo qualità di laboratorio), un controllo negativo ed uno positivo contenente un basso livello del Clostridium difficile GDH devono essere testati.

XI. LIMITI DEL TEST

- C. difficile GDH indica unicamente la presenza di Clostridium difficile nel campione (analisi qualitativa) e deve essere utilizzato per la determinazione del Clostridium difficile in soli campioni di feci. Con questo test non si possono rilevare valori quantitativi o aumento della concentrazione
- Un eccesso di campione può causare risultati errati (banda marrone). Diluire il campione con il tampone e ripetere il test.
- Alcuni campioni di feci possono diminuire l'intensità della linea di controllo
- La prova deve essere effettuata il più presto possibile dopo l'apertura della busta sigillata
- Questo test fornisce una diagnosi presuntiva di infezione da Clostridium difficile. Una conferma d'infezione dovrebbe essere fatto solo da un medico, dopo che sono stati valutati tutti i dati clinici e di laboratorio sono stati deve essere basata su ulteriori osservazioni cliniche
- I risultati positivi confermano la presenza di Clostridium difficile GDH in campioni di feci. Questo può essere dovuto a ceppi produttori di tossina o non tossinogenici di Clostridium difficile. Un risultato positivo deve essere seguita da ulteriori test per determinare la produzione di tossina.

XII. BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Vaishnavi, Ch., "Clinical spectrum & pathogenesis of Clostridium difficile associated diseases". Indian J. Med. Res. 131, April 2010, pp487-499.

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

CONFEZIONE (25 test)

C. difficile GDH Card

Liq.Extr tubi

Controllo positivo

Istruzioni per l'uso

Ref. VC194065P (25 test)

25 card

25 x 1.0 mL

1 x 0.5 mL

1 pezzo

Codice Ramo CND W0105011702

