

## COMBI GDH-TOX A+B

Per uso diagnostico *in Vitro*

**Test rapido immunocromatografico per la determinazione diretta sulle feci dell'antigene comune GDH e della tossina A e della tossina B di Clostridium difficile, comprensivo dei controlli**

### I. DESTINAZIONE D'USO

COMBI GDH-TOX A+B Card è un test rapido immunocromatografico per la determinazione diretta sulle feci dell'antigene comune GDH e della tossina A e della tossina B di Clostridium difficile.

### II. INTRODUZIONE

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 microorganismo.

### III. PRINCIPIO DEL METODO

La card è costituita da 3 strip differenti una per la determinazione della tossina A, una per la tossina B di C. difficile e un'altra per GDH.

La strip A è composta da una membrana di nitrocellulosa pre-trattata con anticorpi monoclonali murini sulla linea test (T), contro GDH e con un anticorpo policlonale di coniglio sulla banda di controllo (C), contro una proteina specifica. All'inizio della membrana è posto l'assorbent pad su cui è stata adsorbita una soluzione di anticorpi monoclonali murini anti-GDH coniugati ad un lattice di polistirene rosso e una soluzione di controllo (legame specifico proteine) coniugata ad un lattice di polistirene verde, formando due complessi (coniugato colorato).

La strip B è composta da una membrana di nitrocellulosa pre-trattata con anticorpi monoclonali murini sulla linea test (T), contro la tossina A e con un anticorpo policlonale di coniglio sulla banda di controllo (C), contro una proteina specifica. All'inizio della membrana è posto l'assorbent pad su cui è stata adsorbita una soluzione di anticorpi monoclonali murini anti-tossina A coniugati ad un lattice di polistirene rosso e una soluzione di controllo (legame specifico proteine) coniugata ad un lattice di polistirene verde, formando due complessi (coniugato colorato).

La strip C è composta da una membrana di nitrocellulosa pre-trattata con anticorpi monoclonali murini sulla linea test (T), contro la tossina B e con un anticorpo policlonale di coniglio sulla banda di controllo (C), contro una proteina specifica. All'inizio della membrana è posto l'assorbent pad su cui è stata adsorbita una soluzione di anticorpi monoclonali murini anti-tossina B coniugati ad un lattice di polistirene rosso e una soluzione di controllo (legame specifico proteine) coniugata ad un lattice di polistirene verde, formando due complessi (coniugato colorato).

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 corrispondenti. Questo complesso reagisce con gli anticorpi monoclonali anti-Tossina A o anti-Tossina B e GDH nella zona di reazione producendo una banda di colore rosso. In assenza dell'antigene specifico non comparirà alcuna banda test; 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 C. difficile GDH/Tossina A/Tossina B card.** Le card sono in una busta sigillata contenente una bustina di essicante.

**25 flaconi** con 1,0 mL di **soluzione d'estrazione** per GDH, tossina A e tossina B

**10 gocciolatori**

Set di controlli:

**Controllo Positivo (1 x 0,5 mL):** N.1 vial con gocciolatore contenente componenti non-infettivi e Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> come conservante

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

**1 Foglio istruzioni**

### V. STOCCAGGIO E STABILITA'

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. 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.



## VII. 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, detergenti 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 3-4 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 (circa 125 mg) 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.

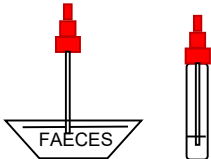
Il trasferimento di una quantità di feci troppo piccola, o la completa mancanza di miscelazione e sospensione delle feci nel liquido di estrazione del campione può causare risultati del test falsamente negativi. Prima del test, miscelare completamente il campione su vortex. L'aggiunta di una quantità eccessiva di campione può causare risultati non validi dovuti al flusso limitato del campione.

### Campioni liquidi o semi-solidi

Usare una pipetta (non inclusa nel kit) per ciascun campione. Dispensare 4-6 gocce di campione (circa 125µL) in un tubo di estrazione. Miscelare su vortex per 15 secondi.

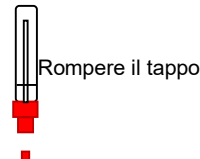
## VIII. PROCEDIMENTO

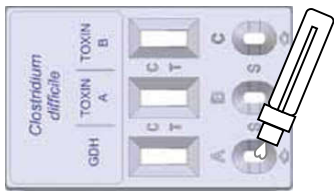
Raccolta campione



Miscelare il campione con il tampone

Rompere il tappo





Addizionare 4 gocce della miscela tampone-campione in ciascun pozzetto

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 4 gocce di campione (100 µL) nelle finestre circolari della card.
4. Attendere 10 minuti, quindi osservare la comparsa delle bande colorate.

### Procedimento per i controlli

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

## IX. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

	A (GDH)	B (Tossina A)	C (Tossina B)	Interpretazione
1.	- verde	- verde	- verde	Negativo, nel campione non ci sono antigeni verso GDH, tossina A e tossina B
2.	+ verde/rosso	+ verde/rosso	+ verde/rosso	Positivo, nel campione sono presenti antigeni per GDH, tossina A e tossina B
3.	+ verde/rosso	+ verde/rosso	- verde	Positivo, nel campione sono presenti antigeni per GDH e tossina A
4.	+ verde/rosso	- verde	+ verde/rosso	Positivo, nel campione sono presenti antigeni per GDH e tossina B
5.	+ verde/rosso	- verde	- verde	Positivo, nel campione sono presenti antigeni per GDH
6.	- verde	+ verde/rosso	+ verde/rosso	Ripetere con un nuovo campione. Se il risultato si ripete tal quale bisogna considerare il campione positivo per tossina A e tossina B
7.	- verde	+ verde/rosso	- verde	Ripetere con un nuovo campione. Se il risultato si ripete tal quale bisogna considerare il campione positivo per tossina A
8.	- verde	- verde	+ verde/rosso	Ripetere con un nuovo campione. Se il risultato si ripete tal quale bisogna considerare il campione positivo per tossina B
9.	Qualsiasi altro risultato			I risultati non sono validi per tutte e tre le strip. Si consiglia di ripetere lo stesso campione su un altro dispositivo

## X. 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.

## XI. CARATTERISTICHE VALIDAZIONE DEL TEST TOXINA A+B

### 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 diarrea da antibiotici.

### COMBI GDH-TOX A+B – Sensibilità e Specificità cliniche (GDH)

E' stato condotto uno studio su campioni fecali provenienti da pazienti. La determinazione di GDH con COMBI GDH-Tox A+B ha mostrato una sensibilità ed una specificità >99% in confronto al test C. DIFF. QUICK CHECK Complete® Techlab e una sensibilità >95% e una specificità >99% in confronto al test Wampole™-60, Techlab.

### COMBI GDH-TOX A+B – Sensibilità e Specificità cliniche (tossina A e B)



E' stato condotto uno studio su campioni fecali provenienti da pazienti. La determinazione di tossina A e B con COMBI GDH-Tox A+B ha mostrato una sensibilità ed una specificità >99% in confronto con il test C. DIFF. QUICK CHECK Complete® Techlab.

### 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 di Tossina B.

### C. Difficile Antigene GDH – Sensibilità Analitica

Le performance del test sono state valutate usando soluzioni diluite di Antigene GDH purificata. Il sistema è in grado di determinare la concentrazione di 0.8 ng/mL di antigene GDH.

### Cross-reattività













Per determinare la cross-reattività del test è stata fatta una valutazione provando i più comuni patogeni intestinali, altri organismi e patogeni occasionalmente presenti nelle feci. Non c'è cross-reazione per i seguenti organismi: *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp*, *E.ColiO157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Staphilococcus aureus*, *Yersinia spp* and *Yersinia enterocolitica*.

## XII. LIMITI DEL TEST

- COMBI GDH-TOX A+B Card è un test di screening per determinare la presenza dell'antigene GDH, della tossina A e/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 bande test, test negativo in presenza della sola banda di controllo.
- Il test deve essere fatto entro due ore dall'apertura della busta con card.

## XIII. 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 Vaishnavi, Ch., "Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases". Indian J. Med. Res. 131, April 2010, pp 487-499
- 3 Poutanen, S. M. et al. "*Clostridium difficile*-associated diarrhoea in adults", CMAJ, 171(1) July 2004, pp. 51-58.

 IVD	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Limiti di temperatura	 LOT	Codice del lotto (EXXX)		Fabbricante		Mantenere asciutto	 NON STERILE	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

Card GDH/Toxina A/B  
Gocciolatori  
Flaconi con 1 mL di soluzione d'estrazione  
Controllo positivo  
Istruzioni d'uso

### Ref. VC 194070P

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

Codice Ramo CND W0105011702

