

Clostridium difficile

GDH + TOXINA A + B

Método Inmunocromatográfico rápido en muestra de deposiciones

Catálogo

Presentación

705080

20 det.

Uso Previsto

El presente test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de Toxina A, Toxina B y GDH (Glutamato Deshidrogenasa) del *Clostridium difficile* en muestras de deposición. Éste es un test de screening de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de infección por *Clostridium difficile*.

Resumen

El *Clostridium difficile* (*C. difficile*) es una bacteria Gram- positiva, formadora de esporas, anaeróbica y que es la causa principal de las diarreas asociadas a los antibióticos y a la colitis pseudo-membranosa. Actualmente es uno de los patógenos mas comúnmente detectados y una causa importante de infecciones nosocomiales de los hospitales y guarderías en todo el mundo.

Tras la colonización, el *C. Difficile* libera 2 toxinas de alto peso molecular: la Toxina A y la Toxina B, siendo ambas las responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, que puede ser desde una diarrea acuosa auto-limitante no grave, una colitis pseudo membranosa, megacolon tóxico hasta llegar a causar la muerte.

La Toxina A es una entero toxina que parece interferir con el citoesqueleto de las células del epitelio intestinal haciéndolas no-funcionales, mientras que la Toxina B es una cito toxina que induce fuertes efectos citopáticos en las células de cultivo de tejidos.

La Glutamato Deshidrogenasa del *Clostridium difficile* (GDH) es una enzima producida en grandes cantidades por cepas toxigénicas y no toxigénicas, lo que le hace ser un marcador excelente para determinar la presencia del microorganismo.

Ya que no todas las cepas de *C. Difficile* producen toxinas y aproximadamente un 2% de adultos saludables como también hasta un 50% de niños menores de 2 años pueden estar colonizados con *C. Difficile*, la detección de las toxinas (A y B) en muestras de deposición de los pacientes con diarrea es más significativa que un cultivo de bacterias.

Como técnica de referencia se utiliza el cultivo toxigénico (CT), pero requiere de un trabajo muy laborioso para obtener un buen resultado

Fundamento del Test

El presente test es una prueba inmunocromatográfica de flujo lateral rápida, simple y altamente sensible para la detección confiable de los antígenos de la Toxina A, de la Toxina B y de GDH del *Clostridium difficile* en deposiciones humanas.

La placa test consiste en una envoltura plástica que contiene tres barras diferentes para la detección de Toxina A del *C. difficile* o Toxina B del *C. difficile* o GDH del *C. difficile*. Un anticuerpo monoclonal coloreado, contra Toxina A o B o GDH del *C. difficile*, conjugado a oro coloidal va colocado en el borde izquierdo de la membrana.

Tira A: Es una membrana de nitrocelulosa, fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón contra GDH, en la línea de test (T) de la ventana de resultados, que si es positivo dará color rosado. Y en la línea de Control (C) con anticuerpos policlonales de conejo contra una proteína específica, que siempre se teñirá de color rosado.

Tira B: Es una membrana de nitrocelulosa, fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón contra Toxina A, en la línea de test (T) de la ventana de resultados, que si es positivo, dará color rosado. Y en la línea de Control (C) con anticuerpos policlonales de conejo contra una proteína específica, que siempre se teñirá de color rosado.

Tira C: Es una membrana de nitrocelulosa, fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón contra Toxina B, en la línea de test (T) de la ventana de resultados, que si es positivo, dará color rosado. Y en la línea de Control (C) con anticuerpos policlonales de conejo contra una proteína específica, que siempre se teñirá de color rosado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de GDH, ni Toxina A, ni Toxina B o los antígenos están presentes en una concentración inferior al límite de detección y no se produce reacción con ningún complejo coloreado rosado, por lo que no aparecerán las líneas color rosado en las ventanas de resultados (T)

Independientemente que la muestra sea positiva o no, en las tres tiras, la mezcla continúa moviéndose a través de las membranas hacia los anticuerpos inmovilizados contra la proteína específica localizados en las líneas control, las cuales siempre se deben teñir de rosado, lo cual indica que: 1) se añadió el volumen suficiente de muestra. 2) que el flujo ha sido apropiado y 3) como control interno de los reactivos.

Composición del Kit

- 20 bolsas metalizadas selladas que contienen un sistema de reacción (marcado con anti-GDH, anti-Toxina A y anti-toxina B).
- Estabilidad:** El test es estable, hasta la fecha de expiración, a (2 - 30) °C. ¡¡ NO CONGELAR!!
- 20 Tubos plásticos con 2 ml de sol. extractora (Tapa Lila)
- 20 Pipetas plásticas desechables (para muestras líquidas)
- 3 Controles (+) (uno por cada test), tubitos plásticos y pipetas desechables (para cada uno).

Precauciones

- Este test está diseñado para uso de diagnóstico *in vitro* y por un profesional solamente
- Leer cuidadosamente las instrucciones antes de usar el test.
- No usar mas allá de la fecha de expiración indicada en la etiqueta de la caja.
- No usar pruebas con envoltorio dañado
- Tratar todo el material como si fuese potencialmente peligroso y manejarlo de la misma manera como un agente infeccioso con desinfectantes apropiados o autoclavar a 121°C por lo menos 1 hora.
- No fumar, comer o beber en áreas donde se manejen las muestras o material del kit.
- Usar ropa protectora tales como delantales de laboratorio, guantes desechables o protección a los ojos cuando se están analizando las muestras.
- Evitar cualquier contacto entre las manos y los ojos o nariz durante la recolección y análisis de las muestras.

Recolección y Preparación de la Muestra

1) Notas Preliminares:

- Las muestras se deben recolectar lo más rápido posible después de la aparición de los síntomas.
- Las muestras diluidas se pueden almacenar a 2-8 °C por 3 días, lo cual no interfiere con el análisis. Para un almacenamiento mas prolongado, se deben guardar a -20 °C.
- No se recomiendan ciclos de congelamiento y descongelamiento de la muestra, ya que causa resultados erróneos.

Clostridium difficile

GDH + TOXINA A + B

Método Inmunocromatográfico rápido en muestra de deposiciones

Catálogo

Presentación

705080

20 det.

- No recolectar la muestra en envases que contengan medios de cultivo, preservativos, sueros animales o detergentes, ya que cualquiera de ellos interfiere con el análisis, causando resultados erróneos.

2) Procedimiento

Escribir el nombre del paciente en el tubo plástico que contiene la solución extractora.

1) Abrir el tubo y usando el aplicador de muestra, introducirlo una vez en 4 zonas distintas de la muestra (aprox. 125 mg, en el caso de una muestra sólida). Si la deposición es líquida, transferir 125 µl dentro del tubo.

2) Cerrar muy apretado y mezclar la muestra con el diluyente agitando bastante, hasta que la muestra se disuelva.

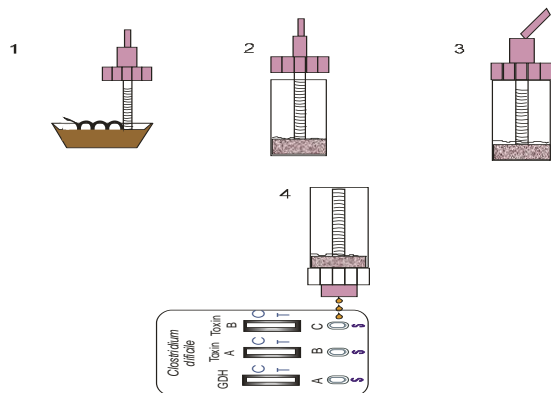
- Dejar en reposo para que las grandes partículas sedimenten o centrifugar a 500-1000 rpm por 1 minuto. La muestra así disuelta, se puede almacenar refrigerada.

- Llevar las muestras y reactivos a temperatura ambiente. Sacar el sistema test de la bolsa metalizada. Una vez abierto, no debe esperar más de 2 hrs.

3) Cortar la punta del tapón del tubo plástico que contiene la muestra.

4) Añadir 3 gotas (100 µl) del líquido a cada una de las ventanas (S) de muestra: A (GDH), B (Toxina A) y C (Toxina B).

5) Leer el resultado a los 15' después de adicionar la muestra a cada celda. (Ver dibujo N° 1)



Dibujo N° 1

Interpretación de los resultados (Ver dibujos y cuadro anexos)

Limitaciones

- Este test está diseñado para detectar solo GDH, Toxina A y/ o Toxina B en heces.

- La intensidad de la línea de test puede variar desde muy fuerte (alta concentración de antígenos) a débil (concentración de antígenos muy cerca del límite de detección del test).

- Utilizar sólo muestras de heces humanas. Otras muestras no han sido determinadas.

- Un resultado positivo, se debe confirmar con técnicas de laboratorio adicionales (Ej: Cultivo Toxigénico), para determinar la cepa. Además, debe estar correlacionado con las observaciones clínicas por parte del médico.

- Un resultado negativo no excluye una infección por *C. Difficile* ya que podría suceder que la concentración de antígenos sea inferior al valor límite de detección. Si los síntomas persisten, se debe repetir con una muestra previamente sometida a enriquecimiento.

Características de la realización

--- Sensibilidad del análisis (límite de detección)

Los límites de detección para el presente test son: 5 ng/mL para GDH; 4 ng/mL para Toxina A y 5 ng/mL para Toxina B

--- Sensibilidad y especificidad clínica (GDH)

Se realizó un estudio con 56 muestras de deposiciones, usando el test actual en comparación con otro método similar proporcionado por Diasorin. Las muestras positivas fueron confirmadas por una prueba ELISA. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

		TEST Diasorin		TOTAL
		+	-	
Test Actual GDH	+	13	1	14
	-	3	39	42
TOTAL		16	40	56

A partir de la tabla anterior, podemos deducir que: la Sensibilidad del presente test versus el de Diasorin de 81 % y la Especificidad es 97,5 % comparada con el mismo método anterior.

--- Sensibilidad y especificidad clínica (Toxina A-B)

Se realizó un estudio con 63 muestras de deposiciones, usando el test actual en comparación con los métodos de citotoxicidad y cultivo celular. Las muestras positivas fueron confirmadas por una prueba ELISA. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

		TEST Citotoxicidad		TOTAL
		+	-	
Test Actual Para Tox. A	+	13	2	15
	-	4	44	48
TOTAL		17	46	63

--- Reacción cruzada

No se detectó reacción cruzada con patógenos gastrointestinales ocasionalmente presentes en las heces: *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *E. Coli*, *H.pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonellas (enteritidis; patatyphi; typhi; typhimurium)*, *Shigellas (boydii; dysenteriae; flexneri; sonnei)*, *Staphilococcus aureus*, *Yersenia enterocolitica*, *Rotavirus* y *Adenovirus*.

Bibliografía

- Lierly, D.M. et al. 1988 . Clin. Microbiol. Rev. 1: 1-18.
- Mulligan, M.E. et al. 1988 J. Clin. Microbiol, 26 : 46-31
- Gilligan, P.H. et al. 1981. J. Clin. Microbiol. 14 : 26 – 31
- George, W.L. 1989 : Anaerobic Infections in human. Academic Press, Inc. NY. 661-678
- Sullivan, N.M.S. et al. 1982. Infect. Immun., 35: 1032-1040.
- Lierly, D.M. et al. 1982. Infect. Immun. 35 : 1147 - 1150