

RIDA® QUICK Clostridium difficile Toxin A/B

REF N0803



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A / B es una prueba de detección rápida inmunocromatográfica para la detección cualitativa de toxinas A y B de *Clostridium difficile* en muestras de heces y en sobrenadantes de cultivos.

2. Resumen y descripción del ensayo

Las enfermedades diarreicas son un efecto secundario relativamente común de los tratamientos antibióticos. Particularmente desde la introducción de la clindamicina a principios de la década de 1970, ha habido una mayor incidencia de formas más graves de la enfermedad que se manifestaron en colitis pseudomembranosa (PMC) a gran escala. Esta diarrea asociada a antibióticos (DAA) es causada principalmente por *Clostridium difficile* y, por lo tanto, se denomina diarrea asociada a *Clostridium difficile* (DACD). Es una de las formas más comunes de infecciones hospitalarias en los países desarrollados. Mientras tanto, la tasa de portadores en pacientes hospitalizados ha aumentado del 16% al 35%. Ahora hemos identificado cepas con una virulencia creciente debido a mecanismos específicos de patogenicidad que han transformado la infección por *Clostridium difficile* (CDI) en un factor de costo significativo en la atención médica. La producción de las toxinas A y B por cepas toxigénicas de *Clostridium difficile* desempeña una función significativa en la manifestación clínica de la enfermedad. Estas proteínas de toxina de alto peso molecular de aproximadamente 300 kDa cada una son inmunológica y funcionalmente distinguibles. La toxina A es una enterotoxina, la toxina B una citotoxina. Ambas toxinas actúan por sí solas, pero también de forma sinérgica. Dado que algunas cepas de *Clostridium difficile* no producen toxinas y alrededor del 2% al 8% de los adultos sanos y hasta el 80% de los niños menores de dos años pueden infectarse con *Clostridium difficile*, la detección de toxinas A y B en muestras de heces junto con la aparición de DACD es principalmente muy importante para la decisión de diagnóstico y tratamiento.

RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A / B es una prueba de detección rápida utilizada para la detección específica de la toxina A y la toxina B simultáneamente en las muestras de heces de pacientes que utilizan anticuerpos **monoclonales**. En tan solo 15 minutos están disponibles los resultados del ensayo, cosa que permite implementar medidas terapéuticas eficaces en una fase temprana.

3. Principio del ensayo

Esta prueba rápida de detección es un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral bajo y de un solo paso en el cual se utilizan anticuerpos antitoxina A y antitoxina B biotinilados, así como también marcados con oro. Tan pronto como las toxinas A o B de *Clostridium difficile* están presentes en una muestra positiva, se forman complejos

inmunitarios con los anticuerpos de la antitoxina A y la antitoxina B marcados, que luego pasan a través de la membrana. La estreptavidina presente en la línea de prueba T se une a los complejos inmunitarios circulantes a través de la biotina emparejada a los anticuerpos de la antitoxina A y la antitoxina B, y produce una coloración rojo-violeta de la línea T. Los anticuerpos continuos marcados con oro no ligados que pasan se unen a la siguiente línea de control C. En el caso de muestras negativas, los complejos inmunitarios marcados con oro se unen solo a la línea C y no a la línea T. La línea C roja siempre muestra si el proceso de prueba fue válido.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 25 determinaciones.

Tabla 1: Reactivos suministrados

Cassette	25 ensayos	25 casetes de prueba envasados individualmente
Reagent A	13.5 ml	Anticuerpos específicos antitoxina A y antitoxina B (ratón); contiene azida de sodio al 0.05%, lista para usar, de color azul
Reagent B	13.5 ml	Anticuerpos específicos antitoxina A y antitoxina B (ratón); contiene azida de sodio al 0.05%, lista para usar, de color amarillo
Pipet	25 unidades	Bolsa con 25 pipetas desechables
Reagent vial	25 unidades	Bolsa con 25 viales de reacción
Pipet Tip	25 unidades	Bolsa con 25 puntas de pipeta
Microlit Pipet	1 unidad	Pipeta para volúmenes de 150 µl

Los materiales peligrosos se indican de acuerdo con las obligaciones de etiquetado. Para obtener más información, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS) en www.biopharm.com.

5. Instrucciones de almacenamiento

El envase puede almacenarse a 2 – 25 °C y puede utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida. Tampoco puede garantizarse la validez de los casetes si su envase está dañado.

6. Reactivos necesarios no suministrados

6.1 Reactivos necesarios

No se necesitan reactivos adicionales para realizar esta prueba.

6.2 Equipo necesario

Para realizar esta prueba se necesitan los equipos siguientes:

Equipo
Agitador vórtex (opcional)
Recipiente para residuos de laboratorio con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 %

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.

Esta prueba solo debe llevarla a cabo personal de laboratorio capacitado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Siga siempre las instrucciones de uso al llevar a cabo esta prueba. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. **Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.** Lleve **equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección)** al manipular los reactivos y las muestras, y lávese las manos después de finalizar el ensayo. No fume, coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.

Para obtener información más detallada, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

Los usuarios son responsables de desechar de manera correcta y responsable todos los reactivos y materiales usados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Los reactivos contienen azida de sodio al 0.05% como conservante. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel ni con las membranas mucosas.

Todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas deben tratarse de igual manera que las muestras infecciosas, con desinfectantes adecuados (p. ej., hipoclorito de sodio) o esterilizarse en autoclave a 121 °C durante por lo menos una hora.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Las muestras de heces se deben recoger en recipientes limpios, sin ningún tipo de aditivo, y almacenarse a 2 – 8 °C antes de comenzar la prueba. Si se almacena durante más de tres días, la muestra debe congelarse a -20 °C (Tabla 2). En este caso, la muestra se descongela completamente y se lleva a temperatura ambiente antes de la prueba. Evite congelar y descongelar repetidamente la muestra.

En caso de utilizar frotis rectales, compruebe si la cantidad de materia fecal es suficiente (aprox. 50 mg) para el ensayo.

Tabla 2: Almacenamiento de muestras

Muestras de heces sin diluir	
2 °C a 8 °C	≤ -20 °C
≤ 3 días	> 3 días

9. Ejecución de la prueba

9.1 Información general

Las muestras, los reactivos y los casetes de la prueba deben llevarse a temperatura ambiente (20 a 25 °C) antes de utilizarlos. Los casetes de prueba solo deben extraerse del envase exterior hasta poco antes de su uso. No reutilice los casetes una vez utilizados. No realice el procedimiento del ensayo con luz solar directa. No regrese el reactivo sobrante a los viales, ya que se pueden contaminar.

9.2 Preparación para la prueba de muestras

Transfiera **0.5 ml** (aproximadamente de 12 a 14 gotas) de reactivo A **Reagent A** e igual cantidad de reactivo B **Reagent B** a un vial de reacción etiquetado **Reagent vial**. Durante este paso, la graduación de 0.5 ml y 1.0 ml en el vial de reacción tiene **prioridad** independientemente del número respectivo de gotas de los reactivos A y B. Los reactivos A y B deben estar en una proporción de **1:1**.

9.2.1 Uso de muestras de heces

En el caso de muestras de heces **líquidas**, utilice la pipeta **Pipet** desechable para suspender 50 µl (hasta la segunda marca) en la mezcla de reactivos previamente pipeteada.

En el caso de muestras de heces **sólidas**, suspenda aproximadamente 50 mg de la misma manera. Luego, cierre herméticamente el vial de reacción y homogeneice la muestra mezclándola bien (o agitando en vórtex). Después, la suspensión homogeneizada debe asentarse durante **5 minutos** para permitir que se forme un sobrenadante esencialmente libre de partículas. Para la sedimentación, el vial de reacción se puede colocar en una de las aberturas centrales del inserto de reactivo.

9.2.1 Uso de cultivos líquidos y sólidos de *Clostridium difficile*

Pipetee y mezcle 50 µl de un **caldo nutritivo** (por ejemplo, caldo de tioglicolato) en 1.0 ml de la mezcla de reactivo preparada previamente en el vial de reacción, compuesta por el reactivo A (0.5 ml) y el reactivo B (0.5 ml). De la mezcla, se utilizarán 150 µl para el análisis de la muestra (sección 9.3).

Cuando se utilizan **medios de cultivo sólidos**, retire tantas colonias como sea posible de la placa de medio de cultivo y luego suspenda completamente en 1 ml de agua destilada o solución salina (0.9% NaCl). A continuación, pipetee y mezcle 50 µl de esta suspensión en 1.0 ml de la mezcla de reactivos previamente preparada en el vial de reacción, compuesta por el reactivo A (0.5 ml) y el reactivo B (0.5 ml). De la mezcla, se utilizarán 150 µl para el análisis de la muestra (sección 9.3).

9.3 Análisis de la muestra

Extraiga el casete de prueba **Cassette** del envase exterior y colóquelo sobre una superficie plana. A continuación, coloque una nueva punta de pipeta **Pipet Tip** en la pipeta Microlit **Microlit Pipet**, y tome 150 µl de sobrenadante del vial de reacción respectivo y pipetee en el área de aplicación del casete de ensayo. Asegúrese de que el líquido pueda fluir a través de la membrana sin dificultad. Si la prueba se realiza correctamente, aparecerá la banda de control en la línea C de control después de aproximadamente 3 minutos. Si la línea de control no es visible después de 3 minutos, deberá sedimentarse mejor una muestra preparada nuevamente (opcionalmente, mediante centrifugación de 2 minutos para 2000 g) y se la pipeteará en el área de aplicación de un nuevo casete de ensayo.

Espere siempre **15 minutos** para leer el resultado de la prueba. El color de las bandas y su intensidad pueden cambiar de rojo-violeta a azul-violeta a gris-violeta durante toda la fase de desarrollo y después del secado de la tira.

10. Control de calidad: indicación de inestabilidad o caducidad de los reactivos

La prueba solo debe evaluarse si el casete de ensayo no presenta daños antes de pipetear la suspensión de la muestra y si no se observan cambios de color ni bandas. Asimismo, después de un período de incubación de 15 minutos, debe observarse por lo menos la banda de control de color rojo-violeta. Si no aparece, compruebe lo siguiente antes de repetir la prueba:

- Fecha de caducidad de los casete de ensayo y de los reactivos utilizados
- Ejecución de la prueba correcta
- La contaminación de los reactivos

Si la banda de control sigue sin aparecer después de repetir el ensayo con un casete de ensayo nuevo, póngase en contacto con el fabricante o con el distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

Deben aparecer un máximo de dos bandas, vistas en el campo de aplicación de la muestra, con la secuencia siguiente: Una banda de reacción de color rojo-violeta en la línea T de la prueba y una banda de control rojo-violeta en la línea C de control. **Si la banda de control no aparece, la prueba no puede evaluarse y debe considerarse no válida.**

Pueden darse las interpretaciones siguientes:

- **Toxina *Clostridium-difficile* positiva:** ambas bandas son visibles.
- **Toxina de *Clostridium difficile* negativa:** solo la banda de control es visible.
- **Inválido:** no se observa ninguna banda o hay otro patrón distinto al descrito antes. De modo similar, las coloraciones de bandas que aparecen después de más de 15 minutos no tienen valor diagnóstico y no deben evaluarse.

12. Limitaciones del método

RIDA®QUICK *Clostridium difficile* Toxin A / B detecta la toxina A o B de *Clostridium difficile* en muestras de heces o en cultivos de *C. difficile* después del enriquecimiento. No puede asociarse la intensidad de las bandas específicas visibles a la aparición o gravedad de síntomas clínicos. **Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con los síntomas clínicos completos.**

Un resultado **positivo** no permite descartar la presencia de otros patógenos infecciosos o causas.

Un resultado negativo no permite descartar la posibilidad de infección con *Clostridium difficile*. Tal resultado puede deberse a la secreción intermitente del patógeno o a una cantidad insuficiente de toxina en la muestra. Si la historia del paciente da pie a sospechar una infección por el patógeno diana, deberá repetirse la prueba con otra muestra de heces del paciente.

Un exceso de muestra de heces puede hacer que la tira reactiva se torne de un color marrón sobre el color rojo violeta de la banda de prueba específica. En estos casos, la prueba debe repetirse con una cantidad menor de heces o una suspensión que se sedimente mejor mediante centrifugación para determinar si las toxinas de *Clostridium difficile* sospechosas están realmente presentes en la muestra, pero se superpusieron por el uso excesivo de matriz de heces.

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad y especificidad clínicas

RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B se comparó con dos ensayos de flujo lateral comercialmente disponibles. Para la comparación, se analizaron 61 muestras de heces con los tres ensayos. Los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: Rendimiento clínico de RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B

		Ensayo 1		Ensayo 2	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B	Positivo	35	0	35	0
	Negativo	4	22	0	26

Concordancia positiva: 94.6% 100%
Coincidencia negativa: 91.7% 100%

13.2 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica de la prueba de detección rápida RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B se determinó por dilución de concentraciones definidas de toxinas puras A y B en serie. Esta serie de diluciones se utilizó para determinar un límite de detección provisional (LoD) que se verificó mediante 30 mediciones utilizando el LoD provisional. Los resultados se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: Sensibilidad analítica del RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B

Concentración de toxinas Toxina A [ng / ml]	RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B		Concentración de toxinas Toxin B [ng/ml]	RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B	
	Lote 1	Lote 2		Lote 1	Lote 2
8.00	Positivo	Positivo	4.00	Positivo	Positivo
7.00	Positivo	Positivo	3.00	Positivo	Positivo
6.00	Positivo	Positivo	2.00	Positivo	Positivo
5.00	Positivo	Positivo	1.00	Negativo	Positivo
4.00	Positivo	Negativo	0.50	Positivo	Negativo
3.00	Negativo	Negativo	0.25	Positivo	Negativo
2.00	Negativo	Negativo	0.13	Negativo	Negativo
1.00	Negativo	Negativo	0.06	Negativo	Negativo
0.50	Negativo	Negativo	0.03	Negativo	Negativo
0.25	Negativo	Negativo	0.02	Negativo	Negativo

De acuerdo con las mediciones para la verificación, se determinó que el LoD de RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B era 5 ng / ml para la toxina A y 2 ng / ml para la toxina B en la muestra. Por lo tanto, el LoD de la mezcla de reacción preparada, que es una dilución 1:21 de la muestra en el reactivo A y el reactivo B, es 0.24 ng / ml para la toxina A y 0.10 ng / ml para la toxina B.

13.3. Precisión

La precisión del ensayo RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B se determinó examinando la precisión intraensayo, la precisión entre días, la precisión entre operadores y la precisión entre lotes. Para cada prueba, se midieron cinco referencias: una negativa, dos débilmente positivas (toxina A y B) y dos moderadamente positivas (toxina A y B).

13.3.1. Precisión intraensayo

La precisión intraensayo se determinó haciendo que un operador midiera las cinco referencias en diez réplicas cada una. RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B mostró una precisión intraensayo del 100%.

13.3.2. Precisión entre días

La precisión entre días se determinó haciendo que dos operadores midieran las cinco referencias por triplicado en diez días diferentes. La precisión entre días fue del 100% para todas las referencias positivas y del 93% para todas las referencias negativas, lo que se encuentra dentro de un límite aceptable.

13.3.3. Precisión entre operadores

La precisión entre operadores fue realizada por dos operadores dentro del alcance de la precisión entre días. El ensayo proporcionó resultados reproducibles entre diferentes operadores (ver 13.3.2).

13.3.4. Precisión entre lotes

El mismo operador analizó cada una de las cinco referencias por triplicado en tres lotes de kits. La precisión entre lotes fue del 100%.

13.4. Reactividad cruzada

Se examinó una variedad de microorganismos patógenos en el tracto intestinal usando el ensayo RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B y, aparte de *Staphylococcus aureus*, no demostraron reactividad cruzada. Estas pruebas se realizaron utilizando suspensiones bacterianas (10^7 a 10^9 UFC / ml), cultivos de parásitos (10^7 a 10^9 organismos / ml), sobrenadantes de cultivos celulares de células infectadas con virus y una muestra de heces. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Reactividad cruzada de RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B

Microorganismo	Origen	Resultado
<i>Adenovirus</i>	Sobrenadante de cultivo celular	Negativo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cultivo	Negativo
<i>Astrovirus</i>	Sobrenadante de cultivo celular	Negativo
<i>Bacillus cereus</i>	Cultivo	Negativo
<i>Bacteroides fragilis</i>	Cultivo	Negativo
<i>Campylobacter coli</i>	Cultivo	Negativo
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultivo	Negativo
<i>Candida albicans</i>	Cultivo	Negativo
<i>Citrobacter freundii</i>	Cultivo	Negativo
<i>Clostridium difficile</i>	Cultivo	Negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	Cultivo	Negativo
<i>Clostridium sordellii</i>	Cultivo	Negativo
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cultivo	Negativo
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Cultivo	Negativo
<i>E. coli</i> (O6)	Cultivo	Negativo
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Cultivo	Negativo
<i>Entamoeba</i>	Material de control positivo	Negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cultivo	Negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultivo	Negativo
<i>Giardia lamblia</i>	Muestra de heces	Negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultivo	Negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultivo	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultivo	Negativo
<i>Rotavirus</i>	Sobrenadante de cultivo celular	Negativo
<i>Salmonella enteritidis</i>	Cultivo	Negativo
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cultivo	Negativo
<i>Serratia liquefaciens</i>	Cultivo	Negativo
<i>Shigella flexneri</i>	Cultivo	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultivo	Positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultivo	Negativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cultivo	Negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cultivo	Negativo

13.5 Sustancias interferentes

Las sustancias que se enumeran a continuación no tuvieron ningún efecto en los resultados de la prueba cuando se mezclaron con muestras de heces positivas y negativas para Clostridium difficile Toxin A/B a las concentraciones descritas:










Loperamida	0.02% (p/p)	Sulfato de bario	18.5% (p/p)
Pepto-Bismol	6.3% (v/p)	Ciclamato	1.3% (v/p)
Sangre humana	5% (v/p)		
Ácido esteárico/ácido palmítico (1:1)	40% (p/p)	Metronidazol (solución 0.5%)	3% (v/p)
Mucina	5% (p/p)	Diclofenaco	0.01% (v/p)
Vancomicina	3% (v/p)		

14. Historial de versiones

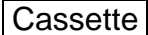




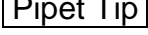
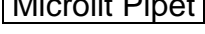
Número de versión	Sección y designación
2010-04-20	Versión anterior
2020-08-10	Revisión general 2. Resumen y descripción del ensayo 4. Reactivos suministrados 7. Advertencias y precauciones para los usuarios 8. Obtención y almacenamiento de muestras 13. Características de rendimiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

	Casete de prueba
	Reactivo A
	Reactivo B
	Pipeta desechable
	Vial de reacción
	Punta de pipeta
	Micropipeta

16. Bibliografía

1. Lyerly, D.M. et al.: Clostridium difficile: Its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. (1988); 1: 1-18.
2. Knoop, F.C. et al.: Clostridium difficile: Clinical disease and diagnosis. Clin. Microb. Rev. (1993); 6: 251-265.
3. Kelly, C.P. et al.: Clostridium difficile Colitis. New Engl. J. Med. (1994); 330: 257-262.
4. Sullivan, N.M. et al.: Purification and characterization of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect. Immun. (1982); 35: 1032-1040.
5. Thomas, D.R. et al.: Postantibiotic colonization with Clostridium difficile in nursing home patients. J. Am Geriatr. Soc. 38, 415-420 (1990).
6. Bartlett, J.G.: Clostridium difficile: Clinical considerations. Rev. Infect. Dis. (1990); 12: 243-251.
7. Loeschke, K., Ruckdeschel, G.: Antibiotikaassoziierte Kolitis - aktualisiert. Internist (1989); 30: 345-353.
8. Enzensberger, R. et al.: Clostridium difficile-induzierte Enterokolitis. DMW (1986); 111: 56-59.
9. Cefai, C. et al.: Gastrointestinal carriage rate of Clostridium difficile in elderly, chronic care hospital patients. J. Hosp. Infect. (1988); 11: 335-339.
10. Samore, M.H. et al.: Wide diversity of Clostridium difficile types at a tertiary referral hospital. J. Infect. Dis. (1994); 170: 615-621.
11. Lipsett, P.A. et al.: Pseudomembranous colitis: A surgical disease? Surgery (1994); 116: 491-496.
12. Asha, N.J. et al.: Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of Antibiotic –associated diarrhea due to Clostridium difficile, Clostridium perfringens, and Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol. (2006); 44: 2785-2791.
13. Voth, D.E., Ballard, J.: Clostridium difficile toxins: Mechanism of action and role in disease. J. Clin. Microbiol. (2005); 18: 247-263.
14. Borgmann, S. et al.: Increased number of Clostridium difficile infections and prevalence of Clostridium difficile PCR ribotype 001 in southern Germany. Eurosurveillance (2008); Vol 13: Bartlett
15. Mc. Donald, L.C. et al.: An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. N. Engl. J. Med. (2005); 353: 2433-2441.
16. Loo, V.G. et al.: A predominantly clonal multi-institutional outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N. Engl. J. Med. (2005); 353: 2442-2449.
17. Bartlett, J.G. , Gerding, D.N.: Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. Clin. Infect. Dis (2008); 46 (Suppl. 1): 12-18.