

RIDA[®] QUICK Clostridium difficile GDH

N° de art.: N0703



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Alemania
Tel.: +49 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 61 51 81 02-20



1. Campo de aplicación

Para el diagnóstico *in vitro*. El RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH es un ensayo inmunocromatográfico rápido para la determinación cualitativa del glutamato deshidrogenasa específica del *Clostridium difficile* en muestras de heces.

2. Resumen y explicación del ensayo

Clostridium difficile es un componente de la flora normal de las heces humanas como bacilo anaerobio formadores de esporas. El índice poblacional de este germen patógeno, inofensivo en condiciones normales, es con 80% muy alto en la niñez temprana. Con el paso del tiempo este índice va decreciendo progresivamente, siendo en promedio de 2 a 10% en individuos de edad adulta. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias, como por ejemplo durante un internamiento hospitalario, puede elevarse fácilmente a más de 30%. Para que el *Clostridium difficile* ocasione una infección (CDI) es decisivo que genere las toxinas proteicas de alto peso A (enterotoxina) y B (citotoxina). Puesto que no todas las cepas del *Clostridium difficile* generan toxinas y ya que aproximadamente 2% a 8% de los adultos saludables así como hasta un 80% de los niños menores de dos años pueden tener *Clostridium difficile*, únicamente la evidencia de las toxinas A y B tendrán significancia patognómica para la sospecha de una diarrea asociada al *c. difficile* (CDAD). Para ello es preciso en primer lugar que el intestino grueso haya sido exitosamente poblado por bacterias *c. difficile* capaces de generar toxinas. La colonización queda favorecida por la reducción de la flora intestinal que protege en casos normales. Si, por ejemplo, ésta estuviese perturbada como consecuencia de una antibiosis u otros factores que afecten la inmunidad intestinal, se podrán multiplicar en particular cepas de *c. difficile* que muestren una resistencia amplia y creciente contra diferentes antibióticos. Otros factores de virulencia tales como la mayor producción de toxina como resultado de defectos de regulación de algunas cepas recientemente definidas han hecho del *c. difficile* un "reemerging germ" cuya patogenidad no solamente se limita a personas que sufren de una infección con *Clostridium difficile* (CDI) consecuencia de un tratamiento antibiótico, sino que cada vez más afecta también a personas no tratadas y no hospitalizadas. La creciente significancia, en particular como germen hospitalario, se ha traducido en nuevos conceptos terapéuticos pero sobre todo en nuevos algoritmos en el diagnóstico del *c. difficile*. El objetivo perseguido en primer plano es comprobar la existencia del *c. difficile* con el fin de prevenir su transmisión a pacientes hospitalizados independientemente de que se trate de cepas toxígenas o no toxígenas del *c. difficile*. Como sensible marcador serológico se recomienda una enzima muy común en muchos organismos y de gran número de duplicados: el glutamato deshidrogenasa (GDH). Ya que esta enzima también aparece en muchas bacterias intestinales, es decisivo que los sistemas de determinación registren con certeza y alta sensibilidad el GDH específico del *c. difficile*. Este ensayo rápido RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH satisface en alto grado ambas exigencias.

Sin embargo no sustituye la determinación obligada de las toxinas A y B de la infección CDI sino que mejora, ejecutada inmediatamente antes o paralelamente al ensayo RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B, el registro seguro de este importante germen hospitalario. El diagnóstico de la infección CDI y la decisión de una terapia adecuada no serán posibles antes de verificar los síntomas específicos de la enfermedad y determinar las toxinas A y B.

3. Principio del ensayo

Este ensayo rápido es un ensayo inmunocromatográfico lateral-flow de fase única en el que se utilizan tanto anticuerpos Anti-GDH biotinilizados como marcados con oro. Si en una muestra positiva estuviera presente el Clostridium difficile GDH, con los anticuerpos Anti-GDH marcados se formarán inmunocomplejos que pasan a través de la membrana. La estreptavidina que se encuentra en la línea de ensayo fija los inmunocomplejos a través de la biotina acoplada a los anticuerpos Anti-GDH, haciendo que la línea T adquiera un color rojo-violeta. En la línea de control siguiente C se fijan los anticuerpos pasantes no complejados, marcados en oro. Por tal razón, en caso de muestras negativas fijación de los inmunocomplejos marcados en oro no tiene lugar la en la línea T sino únicamente en la línea C. La línea C roja mostrará siempre si el proceso del ensayo fue válido.

4. Contenido del paquete

Los reactivos de un paquete alcanzan para 25 determinaciones

Cassette	25 determinaciones	25 casetes de ensayo empacados individualmente
Reagent A	13,5 ml	Anticuerpos anti GDH específicos; contiene 0,05 % de azida, listos para su uso, coloreados en azul
Reagent B	13,5 ml	Anticuerpos anti GDH específicos; contiene 0,05 % de azida, listos para su uso, coloreados en amarillo
Pipet	25 unidades	Bolsa de 25 pipetas desechables
Reagent vial	25 unidades	Bolsa de 25 microtubos
Pipet Tip	25 unidades	Bolsa de 25 puntas de pipeta
Microlit Pipet	1 unidad	Pipeta para un volumen de 150 µl

5. Reactivos y su almacenamiento

El paquete puede almacenarse de 2 a 25 °C y podrá utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa. Una vez llegada la fecha de caducidad ya no se podrá asumir ninguna

garantía de calidad. Del mismo modo, si el empaque de los casetes se encontrase dañado ya no se podrá garantizar que se puedan utilizar los casetes.

6. Reactivos adicionales y accesorios necesarios

- Agitador Vortex (opcional)
- Contenedor de residuos con una solución de hipocloruro de sodio al 0,5%

7. Medidas de precaución

Únicamente para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo deberá ser efectuado únicamente por personal calificado. Se deberá cumplir las directivas relativas a los laboratorios clínicos. Se deberá seguir estrictamente las instrucciones para la ejecución del ensayo.

Los reactivos contienen azida de sodio como agente conservante. Se deberá prevenir el contacto con la piel o con las mucosas.

No pipetear las muestras ni los reactivos con la boca. Evitar el contacto con heridas cutáneas o con las mucosas. Usar guantes desechables al manipular las muestras. Lavarse las manos una vez concluido el ensayo. En los entornos donde se trabaje con muestras no se deberá fumar, comer ni beber.

Todos los reactivos y materiales que entren en contacto con las muestras potencialmente infecciosas deberán tratarse exactamente como éstas con desinfectantes adecuados (por ejemplo hipocloruro de sodio) o esterilizarse por lo menos durante una hora a 121°C.

8. Recolección y almacenamiento de las muestras

Las muestras de heces se deberán recolectar en contenedores limpios y sin ningún tipo de aditivos, guardándolas hasta el momento del ensayo a una temperatura de 2 a 8 °C. Si se almacena por más de tres días, la muestra se deberá congelar a -20 °C. En este caso, antes de iniciar el ensayo se deberá haber descongelado la muestra completamente y permitido que adquiera la temperatura ambiental. Se deberá evitar que la muestra se congele y descongele repetidamente. Si se desee utilizar frotis rectales se deberá prestar atención a disponer de suficiente material de heces (aproximadamente 50 mg) para la ejecución del ensayo.

9. Ejecución del ensayo

9.1. Generalidades

Antes de su utilización, se deberá llevar todas las muestras, reactivos y los casetes de ensayo a la temperatura ambiente (20 a 25°C). Los casetes de ensayo no se deberán sacar de su empaque sino hasta el momento de su utilización. Los casetes de ensayo que ya se hayan utilizado una vez no se deberán volver a utilizar. Durante el ensayo se deberá

evitar la exposición a la radiación solar directa. Los excedentes de reactivo no deberán devolverse a los contenedores pues podrían ocasionar contaminaciones.

9.2. Preparación de las muestras

En un microtubo **Reagent vial** se colocan **0,5 ml** (aprox. 12 a 14 gotas) del reactivo A **Reagent A** y del reactivo B **Reagent B** respectivamente. **De preferencia** se deberá observar la graduación de 0,5 ml y de 1,0 ml en el microtubo independientemente de la respectiva cantidad de gotas de los reactivos A y B. Se deberá disponer de reactivos A y B en la proporción de 1+1.

9.2.1 Utilización de las muestras de heces

En caso de una muestra de heces **líquida** se suspenderán con la pipeta desechable **Pipet** 50 µl (hasta la segunda graduación) en la mezcla de reactivos preparada.

En caso de una muestra de heces **sólida** se suspenderán análogamente aprox. 50 mg. Paso seguido cerrar bien el microtubo y homogenizar la muestra mezclándola esmeradamente (de ser necesario usando el agitador Vortex). A continuación, la suspensión de deberá dejar sedimentar la suspensión **5 minutos** con el fin que se forme un sobrenadante en su mayor parte libre de partículas. Para la sedimentación se puede colocar el microtubo en uno de los agujeros del portatubos.

9.3. Ensayo con las muestras

Colocar el casete de ensayo extraído del empaque **Cassette** sobre una superficie plana. Se coloca una punta de pipeta nueva **Pipet Tip** en la pipeta Microlit **Microlit Pipet** y se extraen 150 µl de sobrenadante del respectivo microtubo y se pipetea en el campo de aplicación del casete de ensayo. Se deberá prestar atención a que el líquido pase libremente a través de la membrana. De ejecutarse todo correctamente, después de 3 minutos aparecerá la banda de control en la línea de control C. Si no se pudiera ver la línea de control después de 3 minutos, se deberá sedimentar más fuertemente una nueva muestra (opcionalmente centrifugándola dos minutos a 2000 g) y pipetearla en el campo de aplicación de un nuevo casete de ensayo.

El resultado del ensayo se podrá leer siempre después de **15 minutos**. La coloración de las bandas y su intensidad pueden cambiar de rojo-violeta a azul-violeta y hasta gris-violeta.

10. Control de calidad: signos de caducidad de los reactivos

El ensayo se deberá evaluar únicamente si el casete de ensayos se encuentra sellado antes del pipeteado de la suspensión de muestra y no se ven sobre él cambios de color ni bandas. Además, tras el periodo de incubación de 15 minutos se deberá ver la banda de control rojo-violeta. Si esta no apareciera, se deberá verificar lo siguiente antes de repetir el ensayo:

- Grado de conservación de los casetes de ensayo y de los reactivos utilizados.
- Ejecución correcta.
- Contaminación de los reactivos.

Si posteriormente, al repetir el ensayo con un nuevo casete de ensayo, no se pudiera ver la banda de control, póngase en contacto con el fabricante o con su distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

Deberán verse como máximo dos bandas en el siguiente orden desde el campo de aplicación: Una banda de reacción rojo-violeta en la línea de ensayo T y una banda de control rojo-violeta en la línea de control C. **Si la banda de control faltase, el ensayo no se podrá evaluar y será nulo.**

Se pueden realizar las siguientes interpretaciones:

- **Clostridium difficile GDH positivo:** se pueden ver ambas bandas.
- **Clostridium difficile GDH negativo:** se puede ver únicamente la banda de control.
- **Inválido:** no se puede ver ninguna banda o se ve una disposición diferente a la descrita anteriormente. Además, las coloraciones de bandas que tengan lugar mucho después de los 15 minutos no tienen valor de diagnóstico y no deberán evaluarse.

12. Límites del método

El RIDA[®]QUICK Clostridium difficile GDH demuestra específicamente la presencia de glutamato hidrogenasa del Clostridium difficile en muestras de heces. No se podrá deducir una conexión entre la intensidad de las bandas específicas visibles y la aparición o la gravedad de síntomas clínicos. **Los resultados obtenidos se deberán interpretar siempre en conexión con el cuadro clínico.**

Un resultado **positivo** no excluye la existencia de otros gérmenes o causas de infección.

Un resultado **negativo** no excluye una posible infección con Clostridium difficile. Esto podría ser causado por la excreción intermitente del germen patógeno o por una escasa cantidad de GDH específico en la muestra. Si mediante la anamnesia existiese la sospecha fundada de una infección con el germen buscado, se deberá analizar una segunda muestra de heces del paciente.

Un exceso de muestra de heces puede causar una coloración parduzca de la tira de ensayo que cubre la coloración rojo-violeta de la banda de ensayo específica. En tales casos se deberá efectuar un nuevo ensayo con una cantidad menor de muestra de heces o con una suspensión de heces más aclarada por centrifugación con el fin de determinar si el glutamato deshidrogenasa específico buscado del Clostridium difficile se encuentra

verdaderamente en la muestra pero que ha quedado cubierto por el exceso de matriz de heces utilizado.

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad y especificidad clínicas

En un estudio de validación se evaluaron un total de 80 muestras conservadas en congelación con RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH en comparación a la real time - PCR para los 16 S rDNA de C.difficile y a la Elisa para el glutamato deshidrogenasa específico del C.difficile. Los resultados se muestran en la tabla que aparece a continuación.

Tabla 1

Sensibilidad y especificidad del RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH en comparación al RT-PCR y al Elisa

		RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH	
		+	-
RT- PCR / Elisa	+	30	0
	-	1	49

Sensibilidad relativa: 100,0 %

Especificidad relativa: 98,0 %

13.2 Precisión

Para determinar la precisión del ensayo RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH se han examinado la reproducibilidad de intra-assay (10 réplicas / 1 día / 1 operador / 1 lote), la reproducibilidad de inter-day (3 réplicas / 10 días / 1 operador / 1 lote), la reproducibilidad de inter-operator (3 réplicas / 1 día / 3 operadores / 1 lote) y la reproducibilidad de inter-lot (3 réplicas / 1 día / 1 operador / 3 lotes). Para cada examen se midieron 5 referencias: una negativa, dos débilmente positivas y dos medianamente positivas. El ensayo RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH mostró en 100% de las mediciones el resultado esperado.

13.3 Reactividad cruzada

Se examinaron diferentes gérmenes patógenos del tracto intestinal con el ensayo RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH Test no mostrándose ninguna reactividad cruzada. Los exámenes se llevaron a cabo con suspensiones bacterianas (10^5 hasta 10^9 de

KBE/ml), con cultivos parasitológicos (10^7 hasta 10^9 de organismos/ml), con células infectadas con virus de sobrenadantes de cultivos celulares y una muestra de heces.

La lista que aparece a continuación muestra los resultados:

Germen de ensayo	Procedencia	Resultado
Adenovirus	Sobrenadante de cultivo celular	negativo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cultivo	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 bifermentans</i>	Cultivo	negativo
<i>Clostridium difficile</i>	Cultivo	positivo
<i>Clostridium novyi</i>	Cultivo	negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	Cultivo	negativo
<i>Clostridium septicum</i>	Cultivo	negativo
<i>Clostridium sordellii</i>	Cultivo	negativo
<i>Clostridium sporogenes</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>Enterobacter cloacae</i>	Cultivo	negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultivo	negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultivo	negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultivo	negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultivo	negativo
Rotavirus	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	negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultivo	negativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cultivo	negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cultivo	negativo

13.4 Sustancias de interferencia

Las sustancias mencionadas a continuación no mostraron ningún efecto sobre los

resultados del ensayo al mezclarse muestras de heces con Clostridium difficile GDH positivo y negativo en las concentraciones indicadas:

Sulfato de bario (18,5 % m/m), loperamida (antidiarréico; 0,02 % m/m), pepto-bismol (antidiarréico; 6,3 % v/m), mucina (5% m/m), ciclamato (edulcorante artificial 1,3 % v/m), sangre humana (5 % v/m), ácido esteárico / ácido palmítico (mezcla 1:1; 40 % m/m), metronidazol (antibiótico; 3 % m/m), diclofenaco (0,1 % m/m), vancomicina (antibiótico; 3 % m/m).

13.5 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH se limitó mediante 2 operadores en dos lotes del producto efectuando el ensayo con una serie de dilución sobre aprox. 4,6 ng de Clostridium difficile GDH por ml de muestra. El límite de detección se confirmó con 100% de los resultados positivos mediante 60 mediciones a lo largo de 5 días en 2 lotes de 2 operadores con 4,6 ng / ml de muestra.

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: No.49.
15. Mc.Donald, L.C. et al.: An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. N.Engl.J.Med. (2005); 353: 23.
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: 23.
17. Bartlett, J.G., Gerding, D.N.: Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. CID (2008); 46(Suppl. 1): 12-18.