

# RIDA<sup>®</sup> QUICK Clostridium difficile GDH

Cod. art. : N0703



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany  
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Campo di applicazione

Per diagnostica *in vitro*. RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH è un test immunocromatografico per la rilevazione qualitativa di glutammato deidrogenasi specifico di *Clostridium difficile* nei campioni di feci.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Il *Clostridium difficile* è un batterio bastoncello anaerobio sporigeno che si trova normalmente nella flora intestinale dell'uomo. La percentuale di insediamento di questo agente patogeno normalmente innocuo raggiunge livelli fino all'80% nella prima infanzia. Nel corso della vita diminuisce costantemente fino ad arrivare in età adulta ad una media di soli 2-10%. In determinate circostanze come ad esempio durante un ricovero ospedaliero può però facilmente salire fino a oltre il 30%. A causare un'infezione da *Clostridium difficile* (CDI) è la formazione delle proteine tossine A ad alto peso molecolare (enterotossina) e B (citotossina). Poiché non tutti i ceppi di *Clostridium difficile* producono tossine e tra il 2 e l'8% di adulti sani così come fino all'80% dei bambini sotto i due anni possono avere nel proprio corpo un insediamento di *C. difficile*, in caso di sospetto di diarrea da *Clostridium difficile* (CDAD) è importante verificare la presenza delle tossine A e B. Per favorire tale condizione occorre tuttavia una colonizzazione dell'intestino crasso di batteri di *C. difficile* in grado di produrre sufficienti tossine. Solitamente tale colonizzazione è causata da una riduzione della flora intestinale che svolge normalmente una funzione protettiva. Se infatti viene distrutta la flora intestinale in seguito ad un'antibiosi o ad altri fattori che compromettono l'immunità intestinale, possono espandersi ceppi di *C. difficile* che causano un'elevata e sempre crescente resistenza a diversi antibiotici. Altri fattori di virulenza come una forte produzione di tossine a causa di carenza di regolazione di alcuni nuovi ceppi hanno fatto diventare il *C. difficile* un "reemerging germ" la cui patogenicità non si limita più solo a persone che si sono ammalate di un'infezione da *C. difficile* (CDI) in seguito ad un trattamento con antibiotici bensì anche e sempre più a persone non in cura medica e non ricoverate. La crescente rilevanza di tale germe soprattutto come germe da nosocomio ha portato a studiare nuove terapie e soprattutto a sviluppare nuovi algoritmi nella diagnostica di *C. difficile*. L'obiettivo è in primo luogo quello di attestare il *C. difficile* per impedirne la trasmissione in pazienti ricoverati indipendentemente che si tratti di ceppi tossigeni o meno. Indicatore screening particolarmente sensibile è un enzima presente in grandi quantità ed ampiamente diffuso in molti organismi: il glutammato deidrogenasi (GDH). Siccome questo enzima è presente anche in molti batteri intestinali, è decisivo che i sistemi di attestazione individuino il GDH specifico da *C. difficile* in modo sicuro e altamente sensibile. Il presente test RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH è in grado di soddisfare ampiamente entrambi questi requisiti. Non può tuttavia sostituire la prova obbligatoria di attestazione CDI che stabilisce la presenza delle tossine A e B, bensì, se eseguito in sequenza prima o in parallelo con il test RIDA®QUICK Clostridium difficile Tossina A/B, migliora notevolmente l'individuazione sicura di questo germe da nosocomio così importante. Solo i sintomi specifici della malattia e la prova della presenza delle tossine A e B permettono di emettere la diagnosi di CDI e di prendere un'adeguata decisione per la terapia da seguire.

### 3. Principio del test

Il presente test veloce è un test immunocromatografico Lateral Flow ad un livello per il quale vengono impiegati sia gli anticorpi biotinilati che quelli anti-GDH segnati con color oro. Se il *Clostridium difficile* GDH è presente in un campione positivo, si creano complessi immuni con gli anticorpi anti-GDH segnati che passano nella membrana. La streptavidina che si trova nella linea del test T fissa i complessi immuni in arrivo mediante la biotina accoppiata all'anticorpo anti-GDH e si verifica una colorazione rosso violaceo della linea T. Sulla successiva linea di controllo C vengono fissati anticorpi continui, segnati con color oro non complessi. Nei campioni negativi i complessi immuni segnati con color oro non vengono fissati sulla linea T, bensì sulla linea C. La linea C rossa indica sempre se il decorso del test è stato valido.

### 4. Contenuto della confezione

I reagenti di una confezione bastano per 25 determinazioni

Cassette	25 det.	25 cassette singole per cassette test imballate
Reagent A	13,5 ml	anticorpi specifici anti-GDH; contiene lo 0,05% di azoturo; pronto per l'uso, di colore blu.
Reagent B	13,5 ml	anticorpi specifici anti-GDH; contiene lo 0,05% di azoturo; pronto per l'uso, di colore giallo.
Pipet	25	Busta con 25 pipette monouso
Reagent vial	25	Busta con 25 recipienti per reazione
Pipet Tip	25	Busta con 25 punte pipette
Pipet Microlit	1	Pipette per 150 µl volumina

### 5. Reagenti e relativa conservazione

La confezione deve essere conservata a 2-25 °C ed è utilizzabile fino alla data di scadenza indicata. Dopo la data di scadenza non può essere più fornita alcuna garanzia di qualità. Non si può altro modo assicurare l'utilizzabilità delle cassette nel caso in cui la confezione delle stesse sia stata danneggiata.

### 6. Reagenti aggiuntivi necessari - accessori richiesti

- Miscelatore Vortex (optional)
- Cestino per rifiuti con una soluzione di sodio-ipoclorito da 0,5%

### 7. Precauzioni

Solo per diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le disposizioni per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso nell'esecuzione del test.

I reagenti contengono il conservante azoturo di sodio. Evitare il contatto con la pelle o con le mucose.

Non introdurre con la bocca campioni o reagenti mediante pipetta. Evitare il contatto con la cute lesa o con le mucose. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

Tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati con adeguato disinfettante (p.e. sodio-ipoclorite) o sottoposti a sterilizzazione a vapore per almeno un'ora a 121 °C.

## 8. Raccolta e deposito dei campioni

Raccogliere i campioni di feci in contenitori puliti senza additivi e prima di iniziare il test deporli a 2-8°C. In caso di deposito per più di 3 giorni occorre congelare il campione a -20 °C. In questo caso far scongelare completamente il campione prima di iniziare il test e portarlo a temperatura ambiente. Evitare assolutamente il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni. Se devono essere impiegati tamponi rettali occorre assicurarsi che sia disponibile abbastanza campione di feci (circa 50 mg) per l'esecuzione del test.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1. Generalità

Prima dell'utilizzo portare tutti i campioni, i reagenti e le cassette per il test a temperatura ambiente (20 -25 °C). Togliere l'involucro delle cassette per il test solo poco prima del loro impiego. Le cassette non possono essere utilizzate più di una volta. Evitare l'esposizione diretta ai raggi solari durante l'esecuzione del test. Il reagente avanzato non deve riessere inserito nei contenitori in quanto potrebbe contaminarli.

### 9.2. Preparazione della prova dei campioni

In un recipiente per reazione contrassegnato **Reagent vial** vengono inserite rispettivamente **0,5 ml** di gocce di reagente A, **Reagent A** e reagente B, **Reagent B**. Attenersi **rigorosamente** alle misure 0,5 ml e 1,0 ml indicate sul recipiente per reazione. I reagenti A e B devono essere in rapporto 1 + 1.

#### 9.2.1 Impiego dei campioni di feci

In caso di un campione di feci **fluidi** occorre mantenerlo in sospensione mediante la pipetta monouso **Pipet** 50 µl (fino al secondo ispessimento) nella miscela di reagenti preparata.

In caso di campione di feci **solido** esso viene analogamente mantenuto in sospensione a circa 50 mg. Infine chiudere bene il recipiente per reazione ed omogeneizzare il campione mesco-

lando a fondo (vi è la possibilità di vorticare). Successivamente lasciare sedimentare la sospensione omogenea per **5 minuti** in modo che si formi un supernatante senza particelle. Per la sedimentazione il recipiente per reazione deve essere regolato su una delle tre aperture centrali della ricarica di reagenti.

### 9.3. Test dei campioni

Prelevare la **Cassette** dal suo involucro e posizionarla su una base piana. Successivamente collocare una punta da pipette non utilizzata **Pipet Tip** sulla pipetta **Microlit Pipet** e prelevare 150 µl di supernatante dal rispettivo recipiente a reazione per inserirlo mediante pipetta nel campo di applicazione della cassetta per il test. Assicurarsi che il fluido scorra senza ostacoli sulla membrana. Se l'esecuzione è avvenuta correttamente dopo circa 3 minuti si visualizza la banda di controllo sulla linea C. Se dopo 3 minuti non si dovesse vedere la linea di controllo occorre far sedimentare più intensamente un campione prodotto nuovamente (possibilmente mediante una centrifugazione di 2 minuti a 2000 g) e inserirlo mediante pipetta nel campo di applicazione di una nuova cassetta per test.

Il risultato del test è sempre leggibile dopo **15 minuti**. La colorazione delle bande durante tutto il tempo di sviluppo si può intensificare e dopo l'essiccazione della striscia può cambiare da rosso violaceo a blu, grigio violaceo.

## 10. Controllo della qualità - Segni di scadenza dei reagenti

E' possibile analizzare il test solamente se la cassetta per test è intatta prima dell'inserimento mediante pipette della sospensione di campioni e se sulla stessa non sono visibili mutamenti di colore o bande colorate. Inoltre dopo 15 minuti di tempo di incubazione deve essere almeno visibile la banda di controllo rosso violaceo. Se non compare, prima della ripetizione del test verificare quanto segue:

- Periodo di conservazione della cassetta per test e dei reagenti utilizzati
- Corretta esecuzione del test
- Contaminazione dei reagenti

Se anche in caso di ripetizione del test con una nuova cassetta da test non compare la banda di controllo, rivolgersi al produttore o al distributore locale R-Biopharm.

## 11. Valutazione e interpretazione

Possono comparire al massimo due bande, dalla prospettiva del campo di applicazione dei campioni nella seguente sequenza: Una banda di reazione rosso violacea sulla linea del test T ed una banda di controllo rosso violacea sulla linea di controllo C. **Se manca la banda di controllo non si può analizzare il test che risulta pertanto non valido!**

Sono possibili le seguenti interpretazioni:

- **Clostridium difficile GDH positivo:** entrambe le bande sono visibili.
- **Clostridium difficile GDH negativo:** è visibile solo la banda di controllo.
- **Non valido:** Nessuna banda visibile o in un'altra costellazione rispetto a quanto sopra descritto. Anche colorazioni delle bande che dovessero comparire molto dopo i 15 minuti non hanno valore diagnostico e non sono pertanto analizzabili.

## 12. Limiti del metodo

Il RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH attesta la presenza specifica di di glutammato deidrogenasi specifico di Clostridium difficile nei campioni di feci. Non è possibile dedurre una relazione tra l'intensità delle bande specifiche visibili e l'insorgenza o la gravità della sintomatologia clinica. **I risultati ottenuti devono essere sempre interpretati in relazione al quadro clinico.**

Un risultato **positivo** non esclude la presenza di altri agenti patogeni infettivi.

Un risultato **negativo** non esclude la possibile infezione con Clostridium difficile. Essa può essere causata da espulsione intermittente dell'agente patogeno o da quantità troppo bassa di GDH specifico nel campione. Se in relazione all'anamnesi vi è un sospetto fondato di un'infezione con l'agente patogeno ricercato, occorre esaminare un ulteriore campione di feci del paziente.

Un'eccedenza di campione di feci può causare una colorazione marrone delle strisce del test che si va a sovrapporre alla colorazione rosso violaceo della banda del test specifica. In questi casi è necessario eseguire un nuovo test con minor quantità di feci o con una sospensione di feci maggiormente chiarificata mediante centrifugazione, al fine di capire se è presente glutammato deidrogenasi specifico di Clostridium difficile nel campione, e tuttavia la banda del test specifica è stata sovrapposta da troppa matrice di feci impiegata.

## 13. Prestazioni opzionali

### 13.1 Sensibilità e specificità clinica

In uno studio di convalida sono stati misurati in totale 80 campioni di feci congelati nel RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH a confronto del real time RT-PCR per 16 S rDNA di C. difficile e di Elisa per glutammato deidrogenasi specifico di Clostridium difficile. I risultati sono elencati nella seguente tabella.

Tab.1

Sensibilità e specificità del RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH a confronto con RT-PCR ed Elisa

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

Sensibilità relativa:	100,0 %
Specificità relativa:	98,0 %

### 13.2 Precisione

Per stabilire la precisione del test RIDA<sup>®</sup>QUICK Clostridium difficile GDH sono state esaminate la riproducibilità Intra-Assay (10 repliche / 1 giorno / 1 operatore / 1 lotto), la riproducibilità Inter-Tag (3 repliche / 10 giorni / 1 operatore / 1 lotto), la riproducibilità Inter-Operator (3 repliche / 1 giorno / 3 operatori / 1 lotto) e la riproducibilità Inter-Lot (3 repliche / 1 giorno / 1 operatore / 3 lotti). Per ogni esame sono state misurate 5 referenze: una negativa, due leggermente positive e due medioforti positive. Il test RIDA<sup>®</sup>QUICK Clostridium difficile GDH ha attestato in 100% delle misurazioni il risultato previsto.

### 13.3 Crossreattività

Sono stati esaminati diversi germi patogeni del tratto gastrointestinale con il test RIDA<sup>®</sup>QUICK Clostridium difficile GDH e non sono emersi casi di crossreattività. Sono stati eseguiti esami con sospensioni di batteri (da 10<sup>5</sup> a 10<sup>9</sup> cfu/ml), con colture di parassiti (da 10<sup>7</sup> a 10<sup>9</sup> organismi/ml), con cellule infettate con il virus del supernatante della coltura di cellule e un campione di feci.

I risultati sono elencati nella seguente tabella

<b>Germe del test</b>	<b>Origine/fonte</b>	<b>Risultato</b>
Adenovirus	Supernatante della coltura di cellule	Negativo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Coltura	Negativo
<i>Bacillus cereus</i>	Coltura	Negativo
<i>Bacteroides fragilis</i>	Coltura	Negativo
<i>Campylobacter coli</i>	Coltura	Positivo
<i>Campylobacter jejuni</i>	Coltura	Positivo
<i>Candida albicans</i>	Coltura	Negativo
<i>Citrobacter freundii</i>	Coltura	Negativo
<i>Clostridium bifermentans</i>	Coltura	Negativo
<i>Clostridium difficile</i>	Coltura	<b>positivo</b>
<i>Clostridium novyi</i>	Coltura	Negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	Coltura	Negativo
<i>Clostridium septicum</i>	Coltura	Negativo
<i>Clostridium bordelli</i>	Coltura	Negativo
<i>Clostridium sporogenes</i>	Coltura	Negativo

<i>Cryptosporidium parvum</i>	Coltura	Negativo
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Coltura	Negativo
<i>E. coli</i> (O6)	Coltura	Negativo
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Coltura	Negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	Coltura	Negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Coltura	Negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Coltura	Negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	Coltura	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Coltura	Negativo
Rotavirus	Supernatante della coltura di cellule	Negativo
<i>Salmonella enteritidis</i>	Coltura	Negativo
<i>Salmonella typhimurium</i>	Coltura	Negativo
<i>Serratia liquefaciens</i>	Coltura	Negativo
<i>Shigella flexneri</i>	Coltura	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coltura	Negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coltura	Negativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Coltura	Negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Coltura	Negativo

#### 13.4 Sostanze interferenti

Le seguenti sostanze non hanno avuto nessun effetto sui risultati del test quando sono state mescolate con le concentrazioni indicate nei campioni di feci positivi e negativi *Clostridium difficile* GDH:

Solfato di bario (18,5 % w/w), loperamid (antidiarroico, 0,02 % w/w), pepto-bismol (antidiarroico; 6,3 % v/w), muzin (5 % w/w), ciclamato (dolcificante artificiale 1,3 % v/w), sangue umano (5 % v/w), acido stearico / acido palmitico (miscela 1:1, 40 % w/w), metronidazol (antibiotico 3 % w/w), diclofenac (0,1 % w/w), vancomycin (antibiotico 3 % w/w).

#### 13.5 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica di RIDA®QUICK *Clostridium difficile* GDH è stata limitata da 2 operatori in 2 lotti del prodotto mediante il test di una striscia di diluizione a circa 4,6 ng di *Clostridium difficile* GDH / ml per campione. Il limite di rilevazione è stato confermato con il 100% di risultati positivi di 60 misurazioni per 5 giorni in 2 lotti da 2 operatori con 4,6 ng / ml per campione.

## Letteratura

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.