

Proflow™ *C. difficile* GDH

Per uso diagnostico *in Vitro*

IMPIEGO PREVISTO

Proflow™ *C. difficile* GDH kit è un test rapido qualitativo per la determinazione di *Clostridium difficile* nelle feci di pazienti con diarrea, che rileva l'enzima Glutammato Deidrogenasi prodotto da tutti i ceppi di *C. difficile* (antigene GDH). Il test è quindi uno strumento di screening utile nella diagnosi di infezione da *C. difficile*.

INTRODUZIONE

Il *Clostridium difficile* è un bacillo anaerobio, gram-positivo, che produce spore. Nonostante la maggior parte dei ceppi isolati non sono tossigenici, alcuni di loro producono tossine. Le più importanti sono la Tossina A e la Tossina B, rispettivamente una enterotossina e una citotossina. Queste tossine causano diarrea e possono progredire fino alla colite pseudomembranosa in presenza di antibiotici ad ampio spettro e altri agenti. Altri fattori di rischio sono l'età avanzata, un sistema immunitario indebolito e la permanenza negli ospedali. Le spore prodotte da *C. difficile* sono molto resistenti e possono sopravvivere facilmente nell'ambiente. La trasmissione dell'infezione avviene per contatto diretto attraverso mani o oggetti contaminati. *C. difficile* è identificato come la causa più comune della diarrea nosocomiale negli adulti.

Le infezioni da *C. difficile* (CDI) sono classificate in due gruppi in base alla gravità: diarrea dopo aver assunto antibiotici e colite pseudomembranosa (PMC). Le PMC rappresentano il 7-9% delle CDI. La PMC generalmente comincia con diarrea accompagnata da febbre e crampi addominali. Le lesioni pseudomembranose sono visibili con esami endoscopici. La mortalità dovuta alle infezioni da *C. difficile* varia dallo 0.6 al 1.5%, ma può raggiungere percentuali molto più alte, dal 35 al 50%.

La diagnosi di malattia associata al *C. difficile* deve essere effettuata attraverso una combinazione di riscontri clinici e microbiologici, attraverso la determinazione delle tossine o attraverso la determinazione della glutammato deidrogenasi (GDH) direttamente sul campione fecale. Tutti i ceppi di *C. difficile* isolati producono il GDH. La sua determinazione mostra un'alta correlazione con i risultati ottenuti da colture tossinogeniche e un alto valore predittivo negativo. Pertanto può essere utilizzato come metodo di screening per la determinazione di tossine prodotte dai ceppi di *C. difficile*.

PRINCIPIO DEL METODO

Proflow™ *C. difficile* GDH è un test immunocromatografico a flusso laterale qualitativo per la determinazione dell'antigene GDH in campioni fecali. La membrana è pretrattata, nella zona test, con anticorpi monoclonali specifici anti-GDH. Durante il test, il GDH eventualmente presente nel campione fecale reagisce con il coniugato colorato preadsorbito sul gold pad (anticorpi anti-GDH/microsfere colorate). La miscela si muove lungo la membrana per azione capillare. Gli anticorpi specifici presenti sulla membrana reagiscono con il coniugato formando una banda colorata (T). Il campione continua la migrazione lungo la membrana filtrante fino alla zona di controllo, dove è legato anche un anticorpo generico capace di legare l'anticorpo marcato con le microsfere colorate, dando luogo ad una banda colorata che serve come controllo interno per il corretto funzionamento dei reattivi e per l'adeguato volume di campione usato (C).

REAGENTI

Ogni kit consente l'effettuazione di 20 test per la determinazione del GDH.

Test cassette (GDH card, 20 pezzi). Ciascuna card è confezionata in una busta di alluminio sigillata, contenente un essiccante.

Sample Diluent (diluente del campione): 1 flacone con tappo gocciolatore contenente 21 mL di Diluente del campione (soluzione tampone contenente proteine e conservanti).

Positive Control (Controllo Positivo): 1 flacone con tappo gocciolatore contenente 0,5 mL di Controllo Positivo, GDH ricombinante in un tampone contenente proteine e conservanti.

Pipette in plastica (20 pezzi): pipette in plastica per la raccolta del campione liquido.

Istruzioni per l'uso.

MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO

Cronometro, provette per la preparazione del campione, pipette, vortex.

AVVERTENZE

1. Per solo uso professionale ed *in Vitro*.
2. Non utilizzare dopo la data di scadenza e non usare il test se la confezione è danneggiata.
3. Seguire le istruzioni per l'uso scrupolosamente.
4. Il test è da considerarsi monouso. Non riutilizzare la card per altri test.
5. Non usare reattivi/card provenienti da lotti diversi.
6. Il test deve rimanere nella confezione sigillata fino al momento dell'uso.
7. Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio, indossare indumenti protettivi e guanti monouso, non mangiare bere o fumare nell'area di lavoro.
8. Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi e manipolati nello stesso modo di agenti infettivi.
9. Il test deve essere eliminato in apposito contenitore in accordo alle Norme vigenti.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Tutti i componenti del kit devono essere mantenuti a 2-30 °C. **Non congelare**. I reagenti conservati in questo modo sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.

I flaconi con tappo gocciolatore devono sempre essere chiusi dopo ogni utilizzo e conservati nella scatola insieme agli altri componenti. Dopo la prima apertura, il tampone è stabile fino alla data di scadenza indicata sul flacone.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni di feci testati entro 2 ore dalla raccolta non richiedono refrigerazione. I campioni non testati entro 2 ore dalla raccolta devono essere conservati a 2-8 °C e possibilmente testati entro 24 - 48 dalla raccolta. Qualora i campioni non possano essere testati entro 48 ore, conservare in congelatore a ≤ -20 °C. Non congelare e scongelare ripetutamente i campioni, in quanto ciò

potrebbe portare a risultati errati. I campioni conservati in frigorifero devono essere lasciati a temperatura ambiente prima dell'uso. I campioni congelati devono essere completamente scongelati e miscelati prima del loro utilizzo.

PROCEDIMENTO

1. I campioni, le card e i reagenti devono aver raggiunto temperatura ambiente prima dell'uso.
2. Estrarre la card dalla busta di alluminio e posizionarla su una superficie piana e pulita.
3. In una provetta aggiungere 1 mL di Sample Diluent.
4. Usando una pipetta monouso, trasferire 100 µL di feci liquide (fino alla prima tacca indicata) nella provetta contenente il Sample Diluent. Se il campione è solido, trasferire una piccola quantità (circa 100 mg) nella provetta con il Sample Diluent.
5. Miscelare su vortex.
6. Prelevare 100 µL di campione diluito e trasferirlo nel pozzetto della card (S).
7. Far partire il cronometro e **leggere il risultato dopo 15 minuti**.

PROCEDURE DI CONTROLLO QUALITÀ

Si consiglia di utilizzare un controllo positivo e uno negativo per assicurarsi che il test stia funzionando correttamente.

La linea di controllo (C) è una banda procedurale e dimostra che il test ha funzionato correttamente. Alcune volte sulla membrana potrebbe comparire una sfumatura marroncina che però non influenza la lettura del risultato.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Positivo: appaiono due bande colorate di rosso all'interno della finestra di lettura. Una nella zona del controllo (C) e una nella zona test (T). La presenza di bande di qualsiasi intensità all'interno della finestra di lettura è da intendersi come positivo.

Negativo: appare solo una banda colorata di rosso all'interno della finestra di lettura in corrispondenza della zona del controllo (C). Nessuna banda colorata appare nella zona test (T).

Non valido: all'interno della finestra di lettura si evidenzierà la totale assenza della banda di controllo (C) e questo indipendentemente dalla comparsa o meno della banda test (T).

Un insufficiente volume di campione, una scorretta pratica procedurale o il deterioramento dei reagenti sono le cause più probabili della mancata comparsa della banda di controllo. Verificare la procedura e ripetere il test con un nuovo dispositivo. Se il problema persiste contattare immediatamente Biolife Italiana srl.

LIMITI DEL METODO

1. Il test rileva la presenza della proteina GDH di *C. difficile* in campioni fecali. Il test non può essere utilizzato come unico strumento per diagnosticare malattie associate al *C. difficile*.
2. L'enzima GDH è un enzima caratteristico prodotto da *C. difficile*, ma non distingue tra ceppi tossinogenici e non-tossinogenici. Sono richiesti altri test per confermare la presenza di tossine di *C. difficile*.

PERFORMANCE DEL METODO

A. Determinazione del limite di sensibilità

Gli studi hanno mostrato che il test ha un limite di rilevabilità pari a 1,58 ng/mL di proteina ricombinante in tampone; pari a 17 ng/mg di campione fecale.

B. Studi di cross-reattività:

Proflow™ *C. difficile* GDH è stato testato per la cross-reattività utilizzando campioni addizionati di sangue (20%), Loperamide (4%) e SMECTA® (5%). Non è stata osservata cross-reattività con questi additivi.

C. Studi clinici:

Le prestazioni del kit Proflow™ *C. difficile* GDH sono state valutate attraverso una valutazione ospedaliera, confrontando i risultati ottenuti con il metodo delle colture tossinogeniche. Di seguito i risultati:

Sensibilità: 95.8% [76.9% - 99.8%]*

Specificità: 95.0% [91.6% - 97.1%]*

Valore Predittivo Positivo: 62.2% [44.8% - 77.1%]*

Valore Predittivo Negativo: 99.6% [97.6% - 100%]*

* 95% intervallo di confidenza

BIBLIOGRAFIA

1. Fenner L., Widmer A.F., Goy G., Rudin S., Frei R. (2008). Rapid and Reliable Diagnostic Algorithm for Detection of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. 46 (1). 328-330.
2. Barbut F., and J.C. Petit. (2001). Epidemiology of *Clostridium difficile*-Associated Infections. Clin Microbiol Infect. 7 (8). 405-410
3. Shea-idsa guideline. Cohen S.H.; Gerding D.N., Johnson S., Kelly C.P., Loo V.G., McDonald L.C., Pepin J., Wilcox M.H. (2010). Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA) Infection control and hospital epidemiology. 31 (5)
4. Eastwood K., Else P., Charlett A., Wilcox M. (2009). Comparison of Nine Commercially Available *Clostridium difficile* Toxin Detection Assays, a Real-Time PCR Assay for *C. difficile* tcdB, and a Glutamate Dehydrogenase Detection Assay to Cytotoxin Testing and Cytotoxigenic Culture Methods. J. Clin. Microbiol. 47(10). 3211-3217.
5. Crobach M.J.T., Dekkers O.M., Wilcox M.H., Kuijper E.J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). (2009). Data Review and Recommendations for Diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect. 15. 1053-1066.

CONFEZIONE

17PL3001 Proflow™ *C. difficile* GDH (20 test)

Codice Ramo CND W0105011702



PRODUTTORE : Prolab-Diagnostic, Canada