

STICK/SIMPLE 2A-B DIFF

TEST INMUNOCROMATOGRÁFICO EN UN SOLO PASO PARA LA DETECCIÓN DE LA TOXINA A Y LA TOXINA B DE *Clostridium difficile* EN HECES

Solo para diagnóstico In Vitro

Para uso exclusivo en laboratorios clínicos y en hospitales

Conservar entre 2°C a 30°C

FINALIDAD PREVISTA

El inmunoensayo cromatográfico 2A-Bdiff de OPERON es un procedimiento para la detección cualitativa, en bandas independientes, de la toxina A (TcdA) y de la toxina B (TcdB) de *Clostridium difficile* en heces humanas. Una señal positiva en cualquiera de las dos bandas de las toxinas proporciona un buen indicio de que podamos estar ante una infección por *Clostridium difficile* (CDI) que debería ser tenida en consideración por el clínico.

Se utilizan muestras fecales humanas líquidas o semilíquidas. Debe tenerse cuidado cuando se analizan muestras sólidas ya que puede producirse una colonización asintomática por *C. difficile* no siendo necesaria la administración de un tratamiento específico.

A diferencia de otros inmunoensayos del mercado (ELISA y test rápidos) que sólo permiten la detección conjunta de TcdA y TcdB, sin diferenciarlas en ningún caso, el test 2ABdiff de OPERON permite, haciendo uso de un solo ensayo, diferenciar la presencia de ambas toxinas utilizando dos bandas separadas, una banda roja debajo de la banda azul de control que detecta la presencia de TcdA y otra banda de color rojo encima de la banda azul de control que detecta la presencia de TcdB en la muestra (ver Fig.1).

El test está basado en la captura inmunológica de micropartículas coloreadas durante su paso a través de una membrana sobre la que se han inmovilizado anticuerpos monoclonales específicos frente a TcdA y TcdB en posiciones separadas.

Diagnóstico de infección por *Clostridium difficile* (CDI)

C. difficile produce dos toxinas diferentes que constituyen los factores de virulencia esenciales para desarrollar una CDI. Investigaciones recientes han demostrado que cada una de las dos toxinas por sí solas pueden inducir la enfermedad en hamster.

Se considera que *C. difficile* es el responsable de aproximadamente un 25% de las diarreas relacionadas con el consumo de antibióticos entre los que se encuentran la clindamicina, segunda y tercera generación de cefalosporinas, inhibidores de girasa, ampicilina, amoxicilina,... Además de los síntomas diarreicos, la enfermedad puede derivar en colitis pseudomembranosa (PMC) que necesita urgentemente un tratamiento con antibióticos eficaces frente a *C. difficile* ya que puede llegar a comprometer la vida del individuo. La mortalidad asociada a CDI puede ir desde el 6% hasta el 30%, sobre todo si el paciente sufre de PMC. La CDI inducida por tratamiento previo con antibióticos puede suponer una estancia en el hospital de 6-10 días con los consiguientes gastos adicionales que pueden alcanzar los 6000-8000 euros.

Clostridium difficile es una bacteria anaerobia grampositiva, con capacidad de formar esporas, presente de manera asintomática hasta en un 5% de la población sana. A causa de las hospitalizaciones, la tasa de portadores puede elevarse hasta un 30%.

Los niños suelen estar colonizados por *C. difficile* poco después de nacer pero no tienden a desarrollar cuadros clínicos. Las investigaciones más recientes apuntan a que esto puede ser debido a la falta de receptores para las toxinas en los enterocitos o bien a que el pH fecal del niño es diferente al del adulto e impide la acción de las toxinas.

Como se ha comentado previamente, *C. difficile* puede producir dos toxinas diferentes:

La toxina A (TcdA) (308 kDa) denominada enterotoxina debido a que esta toxina puede inducir todos los síntomas en modelos de hamster. TcdA también llega a mostrar una elevada citotoxicidad pero sólo en células específicas que son especialmente sensibles a ella como las HT-29.

La toxina B (TcdB) (279 kDa) clasificada como citotoxina. En la mayoría de células cultivadas en laboratorio (como Vero, CHO, HeLa, etc.) es aproximadamente 1000 veces más potente que la toxina A. La secuencia de aminoácidos de TcdB varía entre las distintas cepas.

Patrones de detección TcdA / TcdB

Respecto a la producción de estas dos toxinas, las cepas de *C. difficile* se pueden clasificar en los siguientes grupos:

Cepas no-toxigénicas: no son patógenas y carecen de la producción de TcdA y TcdB así como de la toxina binaria.

Cepas TcdA+ TcdB+: son las cepas patógenas más comunes que inducen CDI de entre las cuales los ribotipos 001, 014, 027 y 078 son los más frecuentes en Europa.

Cepas TcdA- TcdB+: fueron identificadas por primera vez por Depitre et al. en Bélgica. Se las considera patógenas a pesar de no producir la toxina A. Entre estas cepas se encuentra el ribotipo 017 responsable de varios brotes endémicos en Norte América. Estas cepas pueden diferenciarse del resto gracias a la combinación de los tests 2A-Bdiff e HYPERdiff.

Cepas TcdA+ TcdB-: estas cepas pueden ser identificadas directamente a partir de la muestra fecal con el test 2A-Bdiff, el primer y único test en el mercado que permite la detección rápida, sencilla y separada de las toxinas A y B haciendo uso de un solo test. Tan sólo se han encontrado unos ejemplares de estas cepas hasta la fecha. Investigaciones recientes muestran que cepas de *C. difficile* mutantes en el gen TcdB son capaces de seguir induciendo CDI en hamster debido a la producción de toxina A. Estos resultados apuntan a la existencia de estas cepas en muestras clínicas.

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL TEST

El test 2A-Bdiff utiliza una combinación de:

1. unas partículas de látex rojas conjugadas a un anticuerpo específico frente a la toxina A que coopera con otro anticuerpo específico para toxina A situado en la membrana, debajo de la banda de control.
2. otras partículas de látex rojas conjugadas a un anticuerpo específico frente a la toxina B que coopera con otro anticuerpo específico para toxina B situado en la membrana, encima de la banda de control.
3. partículas de látex azules conjugadas a un antígeno reconocido por un anticuerpo específico para dicho antígeno unido a la membrana conformando la llamada banda de control del test.

En este test la muestra se trata, en primer lugar, con el tampón diluyente de la muestra (incluido en este kit) para conseguir la extracción de las toxinas a partir de la matriz fecal. Tras la extracción, sólo se necesita



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México

Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas

Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

añadir un volumen determinado de sobrenadante en la tira reactiva y esperar 15 minutos.

Cuando la muestra extraída fluye a través de la membrana del test, las partículas coloreadas migran. En el caso de una muestra positiva, los anticuerpos específicos presentes en la membrana capturarán las partículas coloreadas recubiertas por el antígeno.

Diferentes líneas de color serán visibles, dependiendo del contenido de toxinas en la muestra. Estas líneas se usan para interpretar el resultado a los 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (ver Fig. 1)

FORMATOS DEL TEST

El test 2A-Bdiff está disponible en dos formatos diferentes:

- **Formato Stick:** se trata de la tira reactiva envasada en un sobre de aluminio. Se necesita un tubo (incluido en el kit) o un pocillo de microplaca de 96 pocillos y fondo plano para depositar la muestra extraída y correr el test.

- **Formato Simple:** se trata de la tira reactiva en el interior de una carcasa de plástico. Las muestras extraídas se añaden directamente a la ventana de muestra de la carcasa señalizada con una flecha.

Ambos formatos tienen las mismas prestaciones, la única diferencia está relacionada con la forma de ejecutar el test (ver más abajo los apartados de "Procedimiento" correspondientes).

MATERIALES INCLUIDOS EN EL KIT

- Dispositivos de reacción (formato Simple o Stick).
- Tampón de dilución de la muestra.
- Pipetas de plástico desechables no graduadas (amarillas).
- Pipetas de plástico desechables graduadas.
- Aplicadores de madera para la toma de muestras sólidas.
- Micro-tubos de plástico con cierre de 1.5 mL.
- Tubos de ensayo.
- Soportes para los tubos de ensayo anteriores que permiten mantenerlos en posición vertical, estable.

MATERIALES NO INCLUIDOS EN EL KIT

- Centrifuga adaptada a los micro-tubos de 1.5 mL.
- Vórtex
- Cronómetro

PRECAUCIONES

1. Las muestras de los pacientes (heces) deben ser manipuladas con cuidado ya que pueden contener agentes infecciosos. A lo largo de todo el proceso se deben usar guantes desechables.
2. El tampón de dilución de la muestra contiene azida de sodio como agente anti-microbiano. Evitar el contacto directo con la piel y las mucosas. Desechar de forma apropiada. No usar el tampón si manifiesta indicios de contaminación o precipitación.
3. No comer, beber, fumar, almacenar o preparar alimentos en la zona donde se manejan los reactivos y las muestras.
4. Cuando se finaliza el trabajo, desechar los guantes y, a continuación, en primer lugar, limpiar las manos con desinfectantes alcohólicos. En segundo lugar, lavar las manos con jabón. Finalmente, descontaminar el fregadero con desinfectantes esporocídicos ya que las esporas de *C. difficile* no se eliminan con alcohol.
5. No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
6. Antes de usarlos, dejar que todos los componentes del kit y las muestras fecales alcancen la temperatura ambiente, pues reactivos y/o muestras frías pueden reducir la funcionalidad del test. Se recomiendan de 20 a 30 minutos para alcanzar la temperatura ambiente.
7. Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
8. No usar los componentes del kit después de las fechas de caduci-

dad.

9. En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.
10. En el caso del formato Simple, es muy importante añadir el volumen correcto de muestra extraída al dispositivo de reacción. Si es inferior al indicado, puede ser que no se realice la cromatografía porque no llegue suficiente muestra a la zona de reacción; si es superior, pueden aparecer líneas marrones en vez de rojas o azules.
11. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
12. No usar el test si aparece alguna línea de color en la zona de resultados antes de empezar a usarlo.
13. Es muy importante tomar la cantidad adecuada de muestra: unos 75 mg si son muestras sólidas (una bolita pequeña de unos 4 mm de diámetro) ó 100 µL si son muestras líquidas o semi-líquidas; estas cantidades se extraen en 1 mL de diluyente de la muestra incluido en el kit. Si se toma una cantidad de muestra mayor, basta con mantener la proporción de 75 mg (ó 100 µL) de muestra en 1 mL de diluyente de la muestra. Un exceso de muestra en relación a la cantidad de tampón añadida impide que la cromatografía transcurra de forma correcta; esto es especialmente crítico en el caso de muestras sólidas ya que no es tan sencillo tomar la cantidad adecuada de muestra. Hay que tener en cuenta que el test 2A-Bdiff se ha diseñado para analizar muestras líquidas y semi-líquidas.
14. Es muy importante centrifugar los micro-tubos de 1.5 mL antes de tomar la cantidad específica de sobrenadante para asegurar una correcta cromatografía. No se garantizan buenos resultados si, en lugar de centrifugar los micro-tubos, se espera un tiempo a que las partículas sólidas sedimenten. Esto es especialmente crítico en el caso de heces sólidas al tener más partículas en suspensión que pueden interferir en la cromatografía.
15. En el caso del producto envasado en tubo, es muy importante que se vuelva a cerrar de manera inmediata una vez sacada la tira reactiva dado que una humedad ambiental elevada podría dañar al resto de tiras que permanecen en el interior del tubo.

ALMACENAMIENTO

Se puede conservar a cualquier temperatura comprendida entre 2 y 30°C. Su fecha de caducidad está impresa en los tubos o en los envoltorios de aluminio.

MUESTRAS

- Este test está diseñado para analizar muestras fecales líquidas o semi-líquidas; pueden analizarse muestras sólidas aunque no es lo habitual teniendo en cuenta que la diarrea es un síntoma inherente a la infección por *C. difficile*.
- No usar muestras que hayan sido recogidas en medios de transporte o se les hayan añadido agentes de conservación (como formalina, SAF, PVA o similares) o medios de enriquecimiento ya que su presencia podría interferir con la correcta ejecución del test.
- Se recomienda analizar **muestras frescas sin tratar**. Si se tienen que conservar durante un tiempo, pueden guardarse en el frigorífico (+2-8°C) durante 1 ó 2 días. Para tiempos más largos, deben congelarse a -20°C teniendo en cuenta que algunas muestras se vuelven negativas tras haber sido congeladas.
- En caso de congelación, descongelar totalmente las muestras a temperatura ambiente antes de proceder a su análisis.
- Evitar ciclos de congelación y descongelación con las muestras fecales ya que las toxinas pueden perder su integridad.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS FECALES

Nota General: usar todos Los medios de protección requeridos a lo largo Del desarrollo Del test debido al manejo de muestras infecciosas. Una vez finalizado el trabajo, proceder con la higiene de acuerdo al punto 4 Del apartado “Precauciones”.

El protocolo de preparación de las muestras fecales es el común para formato Simple y Stick:

1. Para heces líquidas o semi-líquidas añadir 4 gotas (~100 µL) de muestra con la pipeta desechable sin graduar (amarilla) a un micro-tubo de 1.5 mL. Si la muestra es sólida, tomar una porción de aproximadamente 75 mg (una bolita pequeña de unos 4 mm de diámetro) con el aplicador de madera y añadirla a un micro-tubo de 1,5 ml etiquetado. *Importante: Homogeneizar la muestra y tomar una porción de al menos tres sitios diferentes de la muestra con el fin de obtener una muestra lo más representativa posible.*
2. Añadir 1 mL de diluyente de la muestra al microtubo anterior de 1,5 mL (o el volumen apropiado para mantener una proporción de 100 µL (ó 75 mg) de muestra en 1 mL de tampón de dilución).
3. Agitar en el vórtex durante 30 segundos o el tiempo necesario para asegurar la total resuspensión de la muestra en el tampón.
4. Centrifugar los micro-tubos de 1.5 mL durante 5 minutos a 700xg (unas 3000 rpm) en una centrifuga pequeña adaptada a estos micro-tubos para sedimentar las partículas sólidas. Si no se dispone de una centrifuga adecuada, esperar unos 3-5 minutos hasta que las partículas sólidas se hayan depositado en el fondo del tubo. En cualquier caso, el mejor funcionamiento del test se consigue usando una solución clara de la muestra extraída tras la centrifugación.

PROCEDIMIENTO SIMPLE 2A-Bdiff

Una vez que las muestras se han preparado como se indica en los apartados anteriores, se procede de la siguiente manera:

- Sacar el dispositivo de reacción de la bolsa de aluminio. Desechar la bolsita de desecante puesto que sólo sirve para preservar el test de la humedad.
- Tomar sobrenadante de la muestra, tras la centrifugación, con una nueva pipeta desechable amarilla y añadir 4 gotas (~100 µL) a la zona para la muestra del dispositivo de reacción (ventana circular señalada con una flecha).
- Esperar exactamente 15 minutos para leer e interpretar el resultado.

PROCEDIMIENTO STICK 2A-Bdiff

Una vez que las muestras se han preparado como se indica en los apartados anteriores, se procede de la siguiente manera:

- Sacar la tira reactiva de la bolsa de aluminio o del correspondiente tubo (volver a cerrarlo inmediatamente para evitar daños debidos a la humedad ambiental).
- Si se usa un tubo de ensayo incluido en el kit, introducir dicho tubo en el soporte incluido en el kit. Tomar un volumen de unos 265 µL (cuarta marca de la pipeta desechable graduada) del sobrenadante de la muestra, tras la centrifugación, y depositarlo en el interior del tubo de ensayo.
- Si se usa una microplaca de 96 pocillos con fondo plano, tomar un volumen de unos 150 µL (tercera marca de la pipeta desechable graduada) por pocillo del sobrenadante de la muestra tras la centrifugación.
- Introducir la tira reactiva en el tubo de ensayo (acoplado al soporte) o en el pocillo de la microplaca con las flechas del adhesivo superior indicando hacia abajo.
- Incubar y leer el resultado exactamente a los 15 minutos en la zona central blanca de la tira (ver Fig. 1)

LECTURA DE RESULTADOS

Las cinco tiras que se muestran en la Fig. 1 son un ejemplo de los distintos resultados que se pueden obtener con el test 2A-Bdiff.

Se distinguen tres bandas coloreadas diferentes:

- **Banda azul:** constituye la banda de control que indica un correcto funcionamiento del test
- **Banda roja superior:** indica presencia de TcdB en la muestra.
- **Banda roja inferior:** indica presencia de TcdA en la muestra.

La banda azul de control debe aparecer siempre. La presencia adicional de cualquiera de las dos bandas rojas indica la presencia de *C. difficile* productor de TcdA y/o TcdB en la muestra analizada.

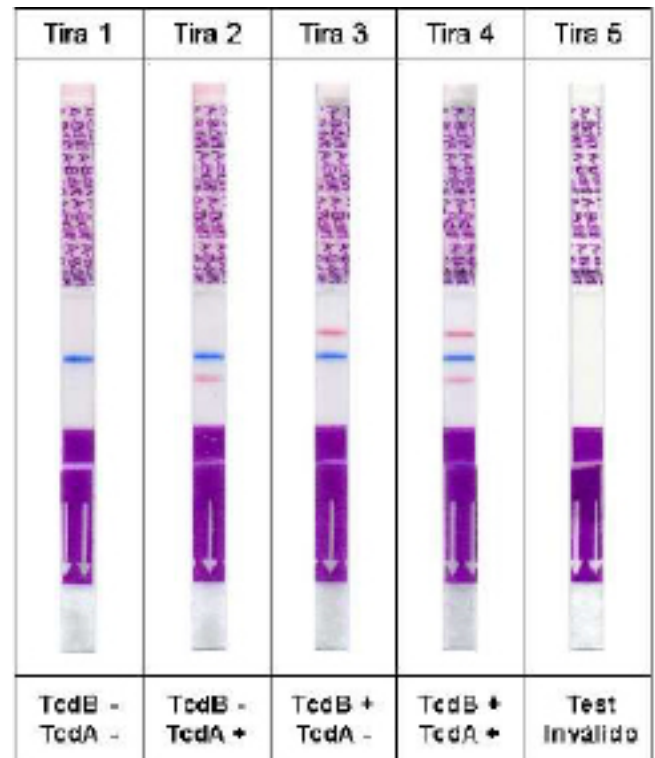


Fig.1 Modelos de posibles resultados. La lectura se indica debajo de Las tiras.

Tira 1: resultado **NEGATIVO:** la muestra no contiene *C. difficile* o contiene una cepa no productora de TcdA / TcdB. Sólo aparece una línea transversal AZUL en la zona central del dispositivo de reacción (en formato Simple alineada con la letra “C” marcada en la carcasa). Esta banda constituye la banda de control y debe aparecer siempre ya que indica que la cromatografía transcurre con normalidad.

Tiras 2-4: resultados POSITIVOS

Tira 2. Detección de TcdA: aparece una banda AZUL (control) y una banda ROJA justo por debajo de la banda de control (en formato Simple alineada con la letra “T1” marcada en la carcasa). La intensidad depende de la concentración de toxina A en la muestra.

Tira 3. Detección de TcdB: aparece una banda AZUL (control) y una banda ROJA justo por encima de la banda de control (en formato Simple alineada con la letra “T2” marcada en la carcasa). La intensidad depende de la concentración de toxina B en la muestra.

Tira 4. Detección de TcdA y TcdB aparece una banda AZUL (control) junto a dos bandas ROJAS (una por encima (TcdB) y otra por debajo (TcdA) de la banda de control).

Tira 5: resultados INVÁLIDOS: no aparece la banda de control azul, el color azul de la banda de control aparece claramente alterado (azul muy

oscuro o morado) o aparecen colores inespecíficos en las bandas positivas (diferentes al rojo). Esto indica un funcionamiento anómalo del test. Algunas de las causas que justifican este hecho pueden ser:

- algunos de los reactivos se han deteriorado o el test ha caducado.
- la muestra no se ha preparado de acuerdo a Las instrucciones de uso.
- la muestra tiene un alto contenido en sangre.

Ante un resultado inválido, se recomienda repetir el test con una nueva tira siguiendo estrictamente las instrucciones de uso descritas en este manual. En el caso de las muestras con sangre, se aconseja el uso de una técnica alternativa pues el problema de la inestabilización no suele depender de la tira empleada sino de la propia matriz de la muestra.

Toda línea que por la naturaleza de la muestra pueda aparecer pasados los 15 minutos de reacción no tendrá valor diagnóstico.

NOTA: El diagnóstico final y definitivo sobre una CDI/PMC lo establece el médico clínico. Este test sólo detecta TcdA / TcdB en una muestra, pero no constituye un argumento para afirmar que la persona padece una CDI.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El test 2A-Bdiff analiza heces humanas de naturaleza líquida o semi-líquida; no se excluye la medida de muestras sólidas aunque el test no se ha optimizado para ello ya que, en ocasiones aisladas, se han observado fenómenos de secuestro de las toxinas con este tipo de matrices sólidas.
2. Este test es cualitativo, no cuantitativo aunque la intensidad de las bandas positivas está relacionada con la cantidad de toxinas detectable en la muestra fecal.
3. Mas de 200 muestras fecales fueron evaluadas para asegurar el correcto funcionamiento del test. La correlación de resultados con otras técnicas (ELISA y Citotoxicidad) fue buena. Sin embargo, este estudio no excluye posibles interferencias en el funcionamiento del test al analizar otras muestras fecales.
4. Con un defecto de muestra pueden aparecer resultados positivos muy débiles. En este caso se debe repetir el test con una cantidad mayor de muestra manteniendo la proporción recomendada con el volumen del diluyente de la muestra (ver apartado de "Preparación de las muestras").
5. Un exceso de muestra puede causar un desarrollo del test muy lento e incluso impedir el correcto desarrollo del test (no se ve la línea control). En este caso se debe repetir el test con una cantidad menor de muestra. Prestar especial atención a este punto cuando se analizan muestras sólidas.
6. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección por parte de *C. difficile* (CDI). El resultado del test debe ser interpretado en relación a los síntomas clínicos del paciente. Además debemos tener en cuenta que las toxinas son moléculas frágiles que pueden degradarse con facilidad debido, por ejemplo, a un almacenamiento inadecuado de la muestra o la presencia de inhibidores haciendo que la concentración de toxinas esté por debajo del límite de detección del test (ver apartado "Sensibilidad Analítica")
7. Un resultado positivo obtenido con una muestra sólida debe ser interpretado con mucha precaución. En principio, la diarrea es un síntoma inherente a la infección por *C. difficile* (CDI) y una muestra sólida implica ausencia de diarrea. El operador del test debe proporcionar información de la naturaleza de la muestra al médico clínico

para que, junto al historial clínico del paciente, se pueda establecer un diagnóstico lo más preciso posible.

8. Se ha detectado la existencia de posibles reacciones cruzadas con otros dos microorganismos:
 - *Clostridium sordellii* produce una toxina letal (TcsL) que es homóloga a la TcdB de *C. difficile*. Para evaluar posibles reacciones cruzadas con TcsL, se crecieron dos cepas de *C. sordellii* (IP82 y RE1522), que producen TcsL, en el medio de cultivo adecuado y el sobrenadante del cultivo de tres días se analizó con el test 2A-Bdiff; no se observó ninguna banda positiva. Suponemos que otras cepas de *C. sordellii* productoras de TcsL tampoco mostrarán reacción cruzada con TcdA y con TcdB en el test 2A-Bdiff.
 - *Entamoeba histolytica*: se ha observado una cierta reactividad cruzada con muestras fecales fuertemente positivas para este parásito. No ocurre así cuando se analiza un extracto puro de *E. histolytica*, sin matriz fecal. Otros ELISA y test rápidos del mercado dieron resultados similares con estas muestras. Se ha comprobado que todas estas muestras fecales con reactividad cruzada muestran el mismo patrón de positividad con el test 2A-Bdiff: la toxina A es negativa mientras la toxina B es positiva débil. Por tanto, se recomienda analizar las muestras que den este resultado con un test *E. histolytica* para confirmar o descartar la presencia de este parásito en la muestra fecal.
9. Se han descrito índices de colonización en niños por parte de *C. difficile* de hasta el 50 %. También se dan elevados índices de colonización en pacientes con fibrosis quística. Normalmente, estos dos grupos de pacientes permanecen asintomáticos por lo que no requieren tratamiento específico. Prestar especial atención a estos resultados positivos sin relevancia clínica ya que los pacientes afectados no requieren tratamiento frente a *C. difficile*.

REFERENCIAS

1. Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, Gerding DN and Rood JI. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature. Apr 2009, Vol: 458(7242) pp: 1176-1179.
2. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A and Minton NP. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature. Oct 2010, Vol: 467(7316) pp: 711-713.
3. Vonberg RP, Reichardt C, Behnke M, Schwab F, Zindler S and Gastmeier P. Costs of nosocomial *Clostridium difficile* associated diarrhoea. J Hosp Infect. Sep 2008, Vol: 70(1) pp:15-20.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:
OPERON S.A.

CAMINO DEL PLANO 19-E-50410
CUARTE DE HUERVA, ZARAGOZA, ESPAÑA