



CoproELISA™ *C. difficile* ToxA/B

Ensayo por Inmunoabsorción ligado a Enzimas (ELISA)

Para la detección de la toxina A y toxina B de *Clostridium difficile* en heces humanas

Manual de Instrucciones

Kit para 96 determinaciones

Número Catálogo: 794-01

Para uso diagnóstico *In Vitro*

Sólo para uso profesional

Almacenar a 2-8 ° C. **No congelar**



Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 7761003

ISRAEL

Tel. +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnosics.com

Normas de Uso

CoproELISA™ *C. difficile* ToxA/B de Savyon es una Ensayo por Inmuno-absorción ligado a Enzimas (ELISA) para la detección de la toxina A y toxina B de *C. difficile* en muestras fecales humanas obtenidas de pacientes sospechosos de tener la enfermedad por *C. difficile*. Los resultados de la prueba, junto con el historial del paciente, están previstos para ayudar en el diagnóstico de *C. difficile* infección (CDI).

Para uso diagnóstico *In-Vitro*

Introducción

El *Clostridium difficile* es una bacteria gram-positiva y anaeróbica que es el agente causal principal de diarrea asociada a antibióticos y colitis pseudomembranosa (1). Este patógeno es capaz de causar la enfermedad que podría ser grave o mortal si no se diagnostica y se trata a tiempo. La exposición a los antibióticos es el principal factor de riesgo para la infección por *C. difficile*. La infección puede desarrollarse si la flora gastrointestinal normal se ve alterada por el tratamiento antibiótico y una persona adquiere *C. difficile* productor de toxina normalmente a través de la vía fecal-oral (2). Los principales factores de virulencia de *C. difficile* son la toxina A y la toxina B (3, 4). Estas toxinas muestran una alta homología de secuencia y funcionalidad. La toxina A ha sido descrita como una enterotoxina que daña el tejido atrayendo a neutrófilos y monocitos, mientras que la toxina B es una citotoxina potente que degrada las células epiteliales del colon (5). La mayoría de las cepas virulentas producen ambas toxinas, sin embargo, las cepas toxina A negativa/toxina B positiva también son capaces de causar la enfermedad (6, 7). La detección por inmunoensayo de la toxina A y toxina B en

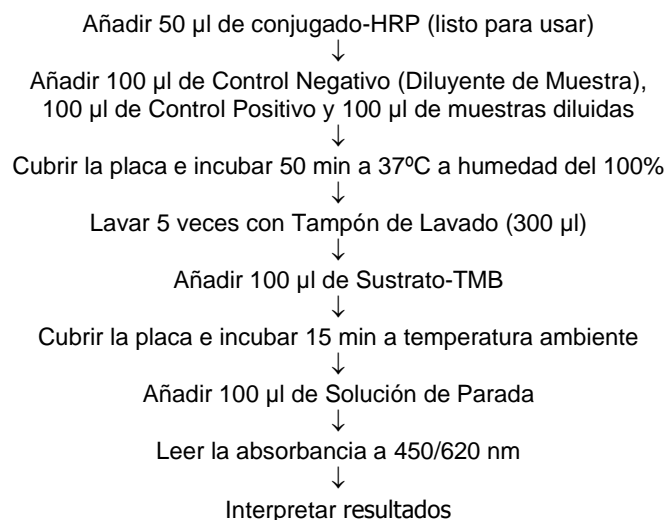
muestras de heces se usa comúnmente como ayuda al diagnóstico.

Principio del Test

CoproELISA™ *C. difficile* ToxA/B es inmunoensayos enzimático para la detección de la toxina A y toxina B en heces humanas.

- Pocillos separables revestidos con anticuerpos policlonales toxina-específicos de *C. difficile*.
- Peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con anticuerpos policlonales anti toxina A y toxina B se añaden a los pocillos revestidos de anticuerpos.
- Las muestras fecales se diluyen en diluyente de muestra y se añaden a los pocillos. En este paso, las toxinas de *C. difficile* son marcadas específicamente por los anticuerpos conjugados de HRP e inmovilizados por los anticuerpos revestidos.
- El conjugado no unido se elimina mediante lavado.
- Con la adición del sustrato TMB, el sustrato se hidroliza mediante la peroxidasa, dando una solución azul del sustrato reducido.
- Con la adición de la solución de parada, el color azul se vuelve amarillo y debe ser leído por lector de ELISA a una longitud de onda de 450/620 nm.
- La absorbancia es proporcional al nivel de toxinas de *C. difficile* en la muestra.

Resumen del Procedimiento Manual/Automatizado*



*Procedimiento de Automatización:

Por favor, siga las siguientes recomendaciones para asegurar una alta calidad de los resultados del test cuando utilice un procedimiento de automatización

- **Dispense la placa en tres grupos** (hasta 4 filas cada vez). Añada la solución de conjugado-HRP al primer grupo, seguido de las muestras diluidas, antes de continuar con el siguiente grupo
- **30 minutos** de incubación de la muestra a 37°C

Contenido del kit para uso Manual / Automatizado

Kit para 96 determinaciones:

1. **Placa revestida con anticuerpo policlonal anti-toxina A y anti-toxina B:**
96 pocillos separables (8x12) revestidos con anticuerpos específicos para toxina A y B, envasados en bolsa de aluminio con una tarjeta desecante.

1 placa

2. **Tampón de Lavado concentrado (20x):** Tampón PBS -Tween
1 botella, 100 ml
3. **Diluyente de Muestra:** Solución tampón lista para usar. Contiene menos del 0.05% de Proclin como conservante. El Diluyente también se usa como solución de control negativa (ver PROTOCOLO DEL TEST)
2 botellas, 50 ml
4. **Conjugado-HRP (verde):** Solución lista para usar con peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con anticuerpos policlonales anti-toxina A y toxina B. Contiene menos del 0.05% de Proclin como conservante. **Puede acumular precipitados de proteínas (inhibidor de proteína) con el tiempo. Asegúrese de eliminarlos con vortex hasta que desaparezcan.**
1 botella, 7 ml
5. **Control Positivo (azul):** Solución lista para usar que contiene toxinas A y B inactivadas. Contiene menos del 0.05% de Proclin como conservante.
1 vial, 2.5 ml
6. **Sustrato TMB:** Solución lista para el uso que contiene 3, 3'5, 5' tetramethylbenzidina como cromógeno y peróxido como sustrato.
1 botella, 16 ml
7. **Solución de Parada:** Solución lista para usar. Contiene H₂SO₄1M
1 botella, 16 ml
8. **Pipetas de plástico desechables:** **100 uds**
9. **Cubreplaca:** **1 unidad**
10. **Manual de Instrucciones:** **1 unidad**

Materiales Necesarios Pero No Suministrados:

1. Tubos de ensayo limpios para la dilución de las heces del paciente.
2. Micropipetas ajustables o pipetas multicanal (rangos 50-200 y 200-1000µl) y puntas desechables.
3. Recolectores desechables de plástico/madera o cucharillas.
4. Matraz volumétrico de un litro.
5. Cilindro volumétrico de 50 ml.
6. Botella de lavado.
7. Papel absorbente.
8. Agitador Vortex.
9. Baño de agua a 37°C con una tapa o una cámara de humedad colocada en un incubador a 37°C.
10. Lector de ELISA equipado con filtros de 450/620 nm.
11. Agua destilada o doblemente desionizada.
12. **Para uso automatizado:** Una centrifugadora equipada con un rotor compatible con tubos de muestra para utilizar en la máquina de automatización.

Advertencias y Precauciones

1. Los reactivos deben llevarse a temperatura ambiente antes de su uso.
2. Cuando manipule los pocillos de ensayo, evite arañar el fondo de los pocillos, ya que esto puede conducir a lecturas de absorbancia elevadas.
3. Las muestras de heces, los pocillos de microensayos, las puntas de las micropipetas y los recolectores y tubos de heces desechables, deben manipularse y eliminarse como materiales potencialmente biopeligrosos después de su uso. Lleve guantes al realizar la prueba.
4. **Los pocillos sin usar se deben colocar de nuevo en la bolsa resellable con el desecante para protegerlos de la humedad.**

5. La solución de sustrato TMB es un material irritante para la piel y las membranas mucosas. Evite el contacto directo.
6. El ácido sulfúrico diluido (H₂SO₄ 1M) es un agente irritante para los ojos y la piel. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente el área con agua y consulte a un médico.

Conservación y Estabilidad de los Reactivos

1. La fecha de caducidad del kit se indica en la etiqueta. Las fechas de caducidad de cada componente se indican en las etiquetas individuales. El kit debe conservarse entre 2° y 8°C y debe devolverse a la nevera cuanto antes después del uso. La exposición a temperatura ambiente durante unas horas de componentes tapados o sellados originalmente, no causará daño a los reactivos. **NO CONGELAR!**
2. Las tiras no utilizadas deben volver a cerrarse en la bolsa de aluminio con la tarjeta desecante, enrollando el extremo abierto y cerrando herméticamente con cinta a lo largo de la longitud de la apertura.

Recogida de heces

1. Son adecuados los procedimientos habituales de recogida y manipulación utilizados en cada centro para muestras fecales o cultivo.
2. Heces conservadas: Esta prueba no es compatible con muestras que hayan sido fijadas con formol al 10% o en Formol Acetato Sódico (SAF). Esta prueba tampoco es compatible con muestras de heces fijadas en Polivinil Alcohol (PVA).
3. Las muestras se deben conservar entre 2° y 8°C y procesarse en 48 horas desde la recogida. Si no puede procesarse en 48 horas, conserve las muestras a -20°C, o menos.
4. Minimice la congelación y descongelación de la muestra ya que puede producir degradación/proteólisis de las toxinas y conducir a una pérdida de actividad.

Protocolo del test para uso manual

A. Preparación de los Reactivos

1. Lleve a temperatura ambiente todos los componentes y muestras a estudiar. Mezcle con Vortex la botella de conjugado HRP durante 15 seg. Determine el número total de muestras a estudiar. Además de las muestras, debe incluirse lo siguiente en cada prueba: un pocillo de Control Negativo (Utilice Diluyente de Muestra para este fin) y un pocillo de Control Positivo.
2. Extraiga la microplaca de su bolsa de aluminio cortando un extremo cerca del sello. Deje el número necesario de tiras (de acuerdo con el número de muestras a estudiar) en el marco de 96 pocillos.
3. Diluya el Tampón de Lavado Concentrado 1/20 con agua destilada o doblemente desionizada. Por ejemplo, para preparar un litro de tampón de lavado, añada 50 ml de Tampón de Lavado Concentrado a 950 ml de agua destilada o doblemente desionizada.

B. Preparación de la muestra

4. Prepare un tubo de dilución para cada muestra a analizar. Se recomiendan tubos Eppendorf de 1.5 ml para este fin. Añada 200 µl de Diluyente de Muestra a cada tubo. Etiquete el tubo.
5. **Mezcle concienzudamente (vortex) la muestra fecal para asegurar que se toman muestras adecuadas.**
6. **Muestras formadas:** Utilice un aplicador de madera o una cucharilla desechable para transferir la muestra fecal

al tubo. Transfiera aproximadamente 0.05 a 0.1 g de muestra (unos 3 mm de diámetro) al Diluyente de Muestra. Mezcle el recolector en el Diluyente de Muestra para eliminar la mayor cantidad de muestra posible y apriete el recolector contra el lateral del tubo para expresar cualquier líquido residual.

Muestras líquidas: transfiera 50 µl de muestra al tubo. Asegúrese de que las muestras líquidas se suspenden de forma uniforme (mediante vortex).

7. Mezcle concienzudamente (vortex) la muestra fecal para asegurar una toma de muestra adecuada. Conserve las muestras diluidas entre 2° a 8° C hasta que se realice el test.

C. Incubación de muestras de heces y controles

8. **Mezcle con Vortex la botella del conjugado HRP*** y dispense 50µl a cada pocillo.
9. Dispense 100 µl de Control Positivo (tapón azul) y 100µl de Control Negativo (por ej, Diluyente de Muestra) en distintos pocillos de la tira de prueba.
10. Dispense 100 µl de muestras de heces diluidas en distintos pocillos de la tira de prueba usando las pipetas desechables suministradas (la marca inferior de la pipeta).
11. Cubra las tiras con un cubreplacas e incube durante 50 min a 37°C en una cámara de humedad.
12. **Paso de lavado:** Deseche el contenido líquido de los pocillos. Llene cada pocillo con Tampón de Lavado hasta la parte superior del pocillo (300 µl). Repita este paso 4 veces hasta un total de **CINCO** veces. Se puede utilizar una máquina automática de lavado.
13. Seque las tiras y el marco golpeándolas suavemente sobre un papel absorbente limpio.

D. Incubación con Sustrato TMB

14. Dispense 100 µl de sustrato TMB en cada pocillo, cubra las tiras con un cubreplacas, e incube a temperatura ambiente durante **15 minutos**.
15. Detenga la reacción añadiendo 100µl de Solución de Parada (H₂SO₄ 1M) en cada pocillo.

F. Determinación de Resultados**

16. Determine la absorbancia a 450/620 nm y registre los resultados. La determinación no debe exceder los 10 minutos tras la detención de la reacción cromogénica.

Nota: El conjugado HRP puede acumular precipitados de proteínas (inhibidor de proteína) con el tiempo. Asegúrese de eliminarlos con vortex hasta que desaparezcan.

****Todas las burbujas de aire deben eliminarse antes de la lectura. El fondo de la placa ELISA debe limpiarse cuidadosamente.**

Protocolo de la prueba para uso automatizado

A. Preparación de los Reactivos

1. Lleve a temperatura ambiente todos los componentes y muestras a estudiar. Mezcle con Vortex la botella de conjugado HRP durante 15 seg. Determine el número total de muestras a estudiar. Además de las muestras, debe incluirse lo siguiente en cada prueba: un pocillo de Control Negativo (Utilice Diluyente de Muestra para este fin) y un pocillo de Control Positivo.
2. Extraiga la microplaca de su bolsa de aluminio cortando un extremo cerca del sello. Deje el número necesario de tiras (de acuerdo con el número de muestras a estudiar) en el marco de 96 pocillos.

3. Diluya el Tampón de Lavado Concentrado 1/20 con agua destilada o doblemente desionizada. Por ejemplo, para preparar un litro de tampón de lavado, añada 50 ml de Tampón de Lavado Concentrado a 950 ml de agua destilada o doblemente desionizada.

B. Preparación de la muestra

4. Prepare un tubo de dilución para cada muestra a analizar (utilice tubos de muestra compatible con el equipo automatizado disponible). Añada 800 µl de Diluyente de Muestra a cada tubo. Etiquete el tubo.
5. **Muestras formadas:** Utilice un aplicador de madera o una cucharilla desechable para transferir la muestra fecal a el tubo. Transfiera aproximadamente 0.2 a 0.3 g de muestra (aproximadamente del tamaño de 2 pequeños guisantes) al tubo de muestra. Mezcle el recolector en el Diluyente de Muestra para eliminar la mayor cantidad de muestra posible y apriete el recolector contra el lateral del tubo para expresar cualquier líquido residual.
Muestras líquidas: transfiera 300 µl de muestra al tubo. Asegúrese de que las muestras líquidas se suspenden de forma uniforme.
6. **Mezcle concienzudamente (vortex) la muestra fecal para asegurar una toma muestra adecuada. Conserve las muestras diluidas entre 2° a 8° C hasta que se realice el test.**
7. Deje el tubo reposar durante al menos 10 minutos hasta que las partículas grandes precipiten (decantación). Asegúrese de que el sobrenadante formado no contiene partículas grandes. En caso necesario, centrifugue los tubos a 1000 g durante 30 seg.
8. Transfiera los tubos de muestra a la correspondiente gradilla en el instrumento automatizado.

C. Incubación del conjugado con muestras de heces y controles

Dispense el conjugado listo para usar y las muestras en cada pocillo en grupos de hasta 4 tiras cada vez, como sigue:

9. Dispense 50µl de conjugado listo para usar en cada pocillo hasta 4 tiras.
10. Dispense 100 µl de Control Positivo (tapón azul) y 100µl de Control Negativo (por ej, Diluyente de Muestra) en distintos pocillos de la tira de prueba (que contienen el conjugado listo para usar).
11. Dispense 100 µl de muestras de heces diluidas en distintos pocillos de la tira de prueba (del grupo de 4 tiras que contienen el conjugado listo para usar).
12. Repita la dispensación del conjugado listo para usar y las muestras al siguiente grupo de 4 tiras, como se describe en los puntos 9 y 11.
13. Incube la placa a 37°C durante **30 minutos**.
14. Realice 5 ciclos de lavado de 300µl usando el tampón de lavado prediluido.
15. Realice 2 ciclos de aspiración con aspirado de barrido.

D. Incubación con Sustrato TMB

16. Dispense 100 µl de sustrato TMB en cada pocillo, cubra las tiras con un cubreplacas, e incube a temperatura ambiente durante 15 minutos.
17. Detenga la reacción añadiendo 100µl de Solución de Parada (H₂SO₄ 1M) en cada pocillo.

E. Determinación de Resultados

18. Determine la absorbancia a 450/620 nm y registre los resultados.

Por favor, tenga en cuenta que cada máquina automatizada tiene comandos técnicos específicos. Por favor, implemente el procedimiento de automatización de Savyon para este kit en el protocolo de operación de su equipo automatizado.

Validación de la Prueba

Para que la prueba sea válida se deben cumplir los siguientes criterios. Si estos criterios no se cumplen, la prueba debe considerarse no válida y debe repetirse.

Control Negativo:

El valor de absorbancia debe ser ≤ 0.07 a 450/620 nm.

Control Positivo:

El valor de absorbancia debe ser ≥ 0.5 a 450/620 nm.

Interpretación de Resultados

Longitud de onda Dual Espectrofotométrica a 450/620 nm

Negativo = OD < 0.08

Positivo = OD ≥ 0.08

Limitaciones del Procedimiento

1. CoproELISA™ *C. difficile* toxA/B detecta toxinas de *C. difficile* en muestras fecales. La detección de toxinas de *C. difficile* en heces se debe tener en cuenta por parte de un médico, en relación con la historia clínica del paciente, antes de hacer un diagnóstico definitivo. La incapacidad de detectar toxina A y toxina B en muestras fecales del paciente, puede no descartar la enfermedad, ya que puede estar provocado por otros factores, como una incorrecta manipulación de la muestra o almacenamiento de las heces. También es posible que los niveles de toxina estén por debajo del límite de detección del kit. CoproELISA™ *C. difficile* toxA/B detecta toxina A o B en heces a niveles de ≥ 3 ng/ml.
2. La estabilidad de las toxinas de *C. difficile* en muestras de heces puede verse afectada, especialmente a bajas concentraciones. Por lo tanto, es importante mantener las muestras a 2-8° C inmediatamente después de la recolección. Las muestras que no son analizadas durante las primeras 48 horas, se pueden congelar/descongelar.
3. Algunas muestras dar bajos niveles de detección. Esto puede estar causado por diferentes razones, como la presencia de una cepa poco toxigénica, bajo nivel de bacterias que producen toxinas, o por factores en heces que interfieren con toxinas de *C. difficile* o el test. Bajo estas condiciones, se recomienda reprocesar las muestras usando nuevas muestras.
4. Algunas cepas de *Clostridium sordellii* producen toxinas que son similares a la toxina A y toxina B de *C. difficile*, sin embargo, no se ha detectado *Clostridium sordellii* en heces de paciente con diarrea asociada a antibióticos.

Características Funcionales del Test

Estudio: Se evaluaron muestras clínicas de heces con el test CoproELISA™ *C. difficile* toxA/B. El estudio se realizó internamente con un total de 86 muestras (Tabla 1) y externamente en un centro médico Israelí en un total de 56 muestras (Tabla 2). Los resultados se compararon con un kit de ELISA de referencia comercial aprobado por la FDA.

Tabla 1:

		Kit de ref		
		Positivo	Negativo	Total
CoproELISA™ <i>C. difficile</i> toxA/B	Positivo	45	1	46
	Negativo	2	38	40
	Total	47	39	86

Sensibilidad: 95.7 %, Especificidad: 97.4 %

PPV: 97.8%, NPV: 95%

Tabla 2:

		Kit de ref		
		Positivo	Negativo	Total
CoproELISA™ <i>C. difficile</i> toxA/B	Positivo	9	1	10
	Negativo	0	46	46
	Total	9	47	56

Sensibilidad: 100 %, Especificidad: 97.9 %

PPV: 90%, NPV: 100%

Reactividad cruzada e interferencia por infecciones mixtas

El test CoproELISA™ *C. difficile* toxA/B fue evaluado utilizando cultivos microbianos y muestras clínicas de heces*. No se observó reactividad cruzada con ningún patógeno y microbio gastrointestinal de la siguiente lista:

Blastocystis, *Campylobacter**, *Cryptosporidium parvum**, *Dientamoeba fragilis**, *Escherichia coli*, *Entamoeba histolitica**, *Enterococcus faecali*, *Enterococcus faesium*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus aerogenes*, *Enterococcus cloacae*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus durans*, *Giardia lamblia**, *Helicobacter pylori**, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella entérica**, y *Shigella**.

Bibliografía

1. Cloud J, Kelly CP, Update on Clostridium difficile associated disease. Curr Opin Gastroenterol. 2007 Jan;23(1):4-9.
2. Owens RC Jr, Donskey CJ, Gaynes RP, Loo VG, Muto CA., Antimicrobial-associated risk factors for Clostridium difficile infection. Clin Infect Dis. 2008 Jan 15;46 Suppl 1:S19-31.
3. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT., Clostridium difficile colitis. N Engl J Med. 1994 Jan 27;330(4):257-62
4. Voth DE, Ballard JD., Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev. 2005 Apr;18(2):247-63.
5. Savidge TC, Pan WH, Newman P, O'Brien M, Anton PM, Pothoulakis C., Clostridium difficile toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. Gastroenterology. 2003 Aug;125(2):413-20.
6. Pituch H, van den Braak N, van Leeuwen W, van Belkum A, Martirosian G, Obuch-Woszczatyński P, Łuczak M, Meisel-Mikołajczyk F., Clonal dissemination of a toxin-A-negative/toxin-B-positive Clostridium difficile strain from patients with antibiotic-associated diarrhea in Poland. Clin Microbiol Infect. 2001 Aug;7(8):442-6.
7. Shin BM, Kuak EY, Yoo SJ, Shin WC, Yoo HM., Emerging toxin A-B+ variant strain of Clostridium difficile responsible for pseudomembranous colitis at a tertiary care hospital in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008 Apr;60(4):333-7.



Representante Europeo Autorizado: Obelis s.a.






Boulevard Général Wahis 53

1030 Brussels, BELGIUM

Tel: +(32) 2. 732.59.54

Fax: +(32) 2.732.60.03

E-Mail : mail@obelis.net

	Límite de Temperatura
	Consultar las instrucciones de uso
	Dispositivo para diagnóstico médico In Vitro
	Fabricante
	Representante Europeo Autorizado