

RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH

REF C0701



1. Uso previsto

Para utilização em diagnóstico *in-vitro*. O RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH é um imuno ensaio enzimático para a detecção qualitativa da glutamato desidrogenase específica de *Clostridium difficile* em amostras de fezes humanas.

2. Sumário e explicação do teste

Clostridium difficile são bactérias estritamente anaeróbias, formadoras de esporos e em forma de bastonete, que fazem parte da flora normal das fezes em humanos.

Uma proposta foi feita em 2016 para reclassificar a bactéria como *Clostridioides difficile*. Ambos os nomes são aceitavelmente utilizados hoje.

Em condições normais, a taxa de colonização desses patógenos em sua maioria inofensivos é muito alta nos primeiros anos da infância, variando até 80 %. Essa taxa diminui constantemente ao longo da vida e não ultrapassa em média de 2 % a 10 % na idade adulta. No entanto, sob certas condições, por exemplo, durante uma internação hospitalar, pode exceder um pouco de 30 %. A formação de toxinas de alto peso molecular A (enterotoxina) e B (citotoxina) é decisivo para uma infecção por *Clostridium difficile* (CDI). Considerando que algumas cepas de *Clostridium difficile* não produzem as toxinas e que aproximadamente de 2 % a 8 % dos adultos saudáveis e até 80% das crianças menores de dois anos de idade podem ser colonizadas com *Clostridium difficile*, a detecção das toxinas A e B sozinho é de significado patognomônico no caso de suspeita de diarreia associada a *C. difficile* (CDAD). No entanto, isso depende da colonização bem-sucedida do intestino grosso com bactérias *C. difficile* capazes de formação suficiente de toxinas. Uma redução na flora intestinal protetora promove a colonização. O desequilíbrio devido ao tratamento com antibióticos, por exemplo, ou outros fatores capazes de prejudicar a imunidade intestinal, pode permitir que especialmente as cepas de *C. difficile*, que têm uma ampla e crescente resistência a vários antibióticos, se espalhem. Outros fatores de virulência, como a produção reforçada de toxinas, resultante dos defeitos de regulação de várias cepas recém-definidas, tornaram a *C. difficile* um "germe re-emergente" com uma patogenicidade que não se limita mais apenas às pessoas que desenvolvem uma infecção por *Clostridium difficile* (CDI) resultante do tratamento com antibióticos, mas também inclui cada vez mais pessoas que não foram submetidas a tratamento e não foram hospitalizadas. A crescente importância desse microrganismo, em particular como patógeno nosocomial, levou a novas abordagens de tratamento e, mais importante, a novos algoritmos para o diagnóstico de infecções por *C. difficile*. O objetivo principal é detectar *C. difficile*, a fim de impedir a transmissão a pacientes hospitalizados, independentemente de as cepas de *C. difficile* serem toxigênicas ou não-toxigênicas. A enzima glutamato desidrogenase (GDH), amplamente difundida em muitos organismos e encontrada em grande número, provou ser um eficaz marcador de rastreamento. Como muitas bactérias intestinais também possuem essa enzima, os sistemas de detecção devem ser

capazes de detectar GDH específico para *C. difficile* com especificidade confiável e alta sensibilidade.

O presente ensaio imunológico com enzima RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH atende a esses dois requisitos em alto nível. Embora este EIA não possa substituir a detecção obrigatória das toxinas A e B como prova de um CDI, melhora a detecção confiável desse patógeno nosocomial significativo quando conduzido sequencialmente antes ou em paralelo com a toxina RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ELISA. Somente os sintomas específicos da doença e a identificação das toxinas A e B tornam possível o diagnóstico de CDI e uma decisão de tratamento adequada.

3. Princípio do teste

O teste RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH emprega anticorpos monoclonais em um método do tipo sanduíche. Estes anticorpos monoclonais contra a glutamato desidrogenase de *Clostridium difficile* são conectados à superfície do poço da placa de microtitulação.

Uma pipeta é usada para colocar uma suspensão da amostra de fezes a ser examinada, bem como os controles no poço da placa de microtitulação, juntamente com anticorpos anti-GDH biotinilados (Conjugado 1) para incubação em temperatura ambiente (20 a 25 °C). Após um estágio de lavagem, o conjugado de estreptavidina poliperoxidase (Conjugado 2) é adicionado e incubado novamente em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C). Qualquer GDH específico para *Clostridium difficile* presente na amostra forma um complexo sanduíche composto por anticorpos imobilizados, GDH e anticorpos conjugados. Um estágio de lavagem adicional remove o conjugado de estreptavidina poliperoxidase solto. Em amostras positivas, a adição de um substrato muda pela enzima conectada, de uma solução incolor nos poços da placa de microtitulação para uma solução azul. A adição de um reagente de parada muda a cor, de azul para amarelo. A extinção é proporcional à concentração de GDH de *Clostridium difficile* encontradas na amostra.

4. Reagentes fornecidos

Os reagentes no kit são suficientes para 96 determinações.

Tabela 1: Reagentes fornecidos

Plate	96 exames	Placa de microtitulação, 12 tiras de microtitulação (quebráveis) no suporte de tira; revestido com anticorpos específicos (mouse) contra glutamato desidrogenase específica para <i>Clostridium difficile</i> .
Diluent 1	100 ml	Tampão de diluição de amostra 1, solução tampão proteica de NaCl, pronta para uso, coloração azul
Wash buffer	100 ml	Tampão de lavagem, solução tampão fosfato de NaCl (concentração 10x); contém 0,1 % de timerosal
Control +	2 ml	Controle positivo, proteína GDH inativa; pronto para uso
Control -	2 ml	Controle negativo (tampão de diluição de amostra); pronto para uso
Conjugate 1	13 ml	Anticorpos conjugados com biotina (mouse) contra glutamato desidrogenase específica para <i>Clostridium difficile</i> em solução proteica estabilizada; pronto para uso; cor verde
Conjugate 2	13 ml	Conjugado de estreptavidina poliperoxidase de proteína estabilizada; pronto para uso; coloração laranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrogênio/TMB; pronto para uso
Stop	12 ml	Reagente de parada; ácido sulfúrico 1N; pronto para uso

As substâncias perigosas são indicadas de acordo com as obrigatoriedades de marcação. Para maiores detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDSs) em www.r-biopharm.com.

5. Instruções de armazenamento

Todos os reagentes devem ser armazenados entre 2 e 8 °C e podem ser usados até a data impressa no rótulo. O tampão de lavagem diluído tem uma vida útil de quatro semanas quando armazenado de 2 a 8 °C e **uma semana quando armazenado de 20 a 25 °C**. A contaminação microbiana deve ser evitada. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término do prazo de validade.

Quando armazenado corretamente de 2 °C a 8 °C, o kit aberto pode ser usado por pelo menos 6 semanas.

A embalagem de alumínio deve ser aberta com tesoura, de modo que o fecho de encaixe não seja separado. As tiras de microtitulação que não forem necessárias devem ser devolvidas à embalagem de alumínio e armazenadas imediatamente à temperatura entre 2 to 8 °C.

O substrato incolor deve também ser protegido da luz direta, para evitar que se decomponha ou fique azul devido à auto-oxidação. Se o substrato ficar azul, ele não deve ser utilizado.

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

6.1 Reagentes necessários

Os seguintes reagentes são necessários para realizar o teste RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH:

Reagentes
Água destilada ou deionizada

6.2 Equipamento laboratorial necessário

Os seguintes equipamentos são necessários para realizar o teste RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH:

Equipamentos
Frascos de amostra
Pipetas descartáveis (n.º do item: Z0001)
Misturador vórtice (opcional, veja 9.3)
Micropipeta para volumes de 50 a 100 µl e 1 ml
Cilindro graduado (1000 ml)
Cronômetro
Dispositivo de lavagem para placas de microtitulação ou pipetas multicanal (300 µl)
Fotômetro para placas de microtitulação (450 nm e filtro de referência de 620 a 650 nm)
Filtro de papel (toalhinhas de laboratório)

7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas. Sempre cumpra estritamente as instruções de usuário para a realização desse teste. Não pipete amostras ou reagentes para a boca, e evite o contato com membranas mucosas ou pele lesionada. Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os espécimes e lave as mãos após concluir o teste. Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas.

Para maiores detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDSs) em www.r-biopharm.com.

O controle positivo fornecido no kit contém a proteína GDH recombinante. Ele deve ser tratado como um material potencialmente infeccioso e manuseado de acordo com as normas de segurança nacionais, assim como as amostras de paciente.

O tampão de lavagem contém 0,1 % de timerosal, usado como conservante. Não se deve permitir que essa substância entre em contato com a pele ou com membranas mucosas.

Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

8. Coleta e armazenamento de amostras

As amostras de fezes devem ser coletadas o mais rápido possível dentro de três dias após a ocorrência de sintomas de diarreia. Até ser utilizado, o material de teste deve ser armazenado de 2 a 8 °C. Se o material não puder ser utilizado para um teste dentro de três dias, recomendamos armazenamento a -20 °C ou menos. Evite congelar e descongelar repetidamente a amostra. Uma amostra de fezes diluída no tampão de diluição da amostra 1:11 pode ser armazenada de 2 a 8 °C por até três dias (Tab. 2).

Tabela 2: Armazenagem de espécimes

Amostras de fezes não diluídas		Amostras de fezes diluídas
2 to 8 °C	≤ -20 °C	2 a 8 °C
≤ 3 dias	> 3 dias	≤ 3 dias

As amostras de fezes e esfregaços fecais não devem ser coletados em recipientes de transporte que contenham meios de transporte com conservantes, soros animais, íons metálicos, agentes oxidantes ou detergentes, uma vez que esses podem interferir no teste RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH. Se forem utilizados esfregaços fecais, certifique-se de que o volume do material fecal seja suficiente (aproximadamente 100 mg) para o teste. O rastreamento de contato deve incluir amostras de fezes de pessoas de contato que não exibam sintomas clínicos, para identificar portadores assintomáticos.

9. Realização do teste

9.1 Informações gerais

Todos os reagentes e a placa de microtitulação Plate devem estar em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C) antes do uso. Quando tiver chegado à temperatura ambiente, retire as tiras de microtitulação da embalagem de alumínio. Misture bem os reagentes imediatamente antes do uso. Após o uso, as tiras de microtitulação (colocadas em embalagens seladas) e os reagentes devem ser armazenados novamente a 2 – 8 °C.

Uma vez utilizadas, as tiras de teste não devem ser reutilizadas. Não utilize reagentes e tiras de microtitulação se a embalagem estiver danificada ou se os frascos não estiverem bem selados.

Para evitar a contaminação cruzada, deve-se evitar que as amostras entrem em contato direto com os componentes do kit.

O teste não deve ser realizado sob luz solar direta. Recomendamos cobrir a placa de microtitulação ou selá-la com uma embalagem plástica para evitar perdas ocasionadas pela evaporação.

9.2 Preparação do tampão de lavagem

Misture uma parte de concentrado de tampão de lavagem **Wash buffer** com nove partes de água destilada. Todos os cristais presentes no concentrado devem ser dissolvidos com antecedência, com calor (banho de água a 37 °C).

9.3 Preparando as amostras

Encha um tubo de ensaio rotulado com 1 ml de tampão de diluição da amostra **Diluent | 1**. Use uma pipeta descartável (item nº Z0001) para aspirar uma amostra de fezes finas (aprox. 100 µl) até logo acima da segunda marcação e adicionar ao tampão no tubo de teste para fazer uma suspensão. No caso de amostras de fezes sólidas, adicione uma quantidade equivalente da amostra de fezes (aproximadamente 50 a 100 mg) usando uma espátula ou alça de inoculação descartável e suspenda.

Homogenize a suspensão de fezes por meio de sucção e ejeção de uma pipeta descartável ou por meio de mistura em um misturador Vortex. Deixe a suspensão repousar por um curto período de tempo (10 minutos) para que as partículas grosseiras das fezes se depositem e use esse sobrenadante clarificado da suspensão das fezes diretamente no teste. Se o procedimento de teste for realizado em um sistema ELISA automatizado, o sobrenadante deve ser livre de partículas. Nesse caso, é aconselhável centrifugar a amostra a 2500 G por 5 minutos.

Indicação: Amostras de fezes diluídas no **Diluent | 1 também pode ser usado em todos os outros RIDASCREEN® ELISAs que também utilizam o **Diluent | 1**.**

9.4 Primeira incubação

Depois de colocar um número suficiente de poços no suporte, adicione 100 µl do controle positivo **Control | +**, controle negativo **Control | -**, ou suspensão de amostra de fezes nos poços. Então adicione 100 µl do anticorpo conjugado com biotina **Conjugate | 1**, misture (batendo levemente na borda da placa) e incube por 60 minutos em temperatura ambiente (20 a 25 °C).

9.5 Lavagem

A lavagem cuidadosa é importante para obter resultados corretos e deve, portanto, ser realizada estritamente de acordo com as instruções. A substância incubada nos poços deve ser esvaziada em um recipiente de dejetos para descarte, de acordo com as normas oficiais. Em seguida, bata a placa sobre papel absorvente para remover a umidade restante. Lave então a placa cinco vezes, usando 300 µl de tampão de lavagem diluído a cada vez **Wash buffer**. Certifique-se que os poços estejam completamente vazios, batendo neles após cada lavagem em uma parte do papel absorvente que ainda esteja seca e não utilizada.

Se uma lavadora de microplacas ou ELISA completamente automatizada for utilizada, certifique-se que a máquina esteja ajustada corretamente, ou solicite as

configurações ao fabricante, se necessário. As ferramentas fornecidas pela R-Biopharm já são programadas com configurações e protocolos de trabalho validados. Para evitar o bloqueio das agulhas de lavagem, apenas devem ser usadas suspensões de fezes livres de partículas (ver 9.3, Preparação das amostras). Certifique-se também de que todo o líquido seja aspirado durante cada estágio da lavagem.

9.6 Segunda incubação

Utilize uma pipeta para encher 100 µl de conjugado com poliperoxidase **Conjugate | 2** nos poços, então incube por 30 minutos em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C).

9.7 Lavagem

Lave do modo descrito em 9.5.

9.8 Terceira incubação

Adicione 100 µl de substrato **Substrate** a cada poço. Então incube a placa por 15 minutos no escuro, em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C). Depois disso, pare a reação adicionando 50 µl do reagente de parada **Stop** a cada poço. Após misturar cuidadosamente (batendo levemente na lateral da placa) **meça a extinção em 450 nm e comprimento de onda de referência de 620 nm.**

Indicação: Amostras de paciente alto-positivo podem criar precipitados negros do substrato.

9.9 Protocolo de teste resumido

Os tempos de incubação descritos nas seções 9.4, 9.6 e 9.8 podem ser significativamente reduzidos se a placa for incubada a 37°C e a uma frequência de vibração de 20 a 25 Hz (DSX-, fabricado pela Dynex). Os tempos de incubação mudam da seguinte maneira:

- 1ª incubação: 30 min
- 2ª incubação: 15 min
- 3ª incubação: 15 min

Os agitadores de placas de microtitulação separados também adequados para uso incluem o termomisturador fabricado pela Eppendorf (configuração de frequência: 850 rpm) e DTS-2 fabricado pela LTF Labortechnik (configuração de frequência: 800 rpm).

10. Controle de qualidade - indicação de instabilidade ou deterioração de reagentes

Para propósito de controle de qualidade, os controles positivo e negativo devem ser usados todas as vezes que o teste for realizado, para garantir que os reagentes estejam estáveis e que o teste seja realizado corretamente. O teste foi realizado corretamente quando o valor de extinção (OD) do controle negativo a 450/620 nm é menor que 0,160 e o valor medido do controle positivo a 450/620 nm é maior que 0,8. Um valor maior que 0,160 para o controle negativo pode indicar que a lavagem não foi suficiente. O desvio dos valores necessários, assim como uma coloração turva ou azulada do substrato incolor antes que seja colocado nos poços, pode indicar que os reagentes estão fora do prazo de validade.

Se os valores estipulados não forem obtidos, os seguintes pontos devem ser verificados antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- O desempenho funcional do equipamento utilizado (por ex., calibração)
- Execução correta do teste
- Inspeção visual dos componentes do kit, à procura de contaminação ou vazamentos – uma solução de substrato que ficou azul não deve ser usada.

Se as condições ainda não tiverem sido cumpridas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor R-Biopharm local.

11. Avaliação e interpretação

11.1 Calculando o ponto de corte

Para estabelecer o ponto de corte, unidades de extinção de 0,10 são adicionadas à extinção medida para o controle negativo.

Ponto de corte = extinção para o controle negativo + 0,10

11.2 Resultado do teste

A avaliação da amostra é positiva se a taxa de extinção for mais que 10 % maior que o valor de corte calculado.

Amostras consideradas limítrofes e que precisam ser testadas novamente são aquelas que apresentam uma taxa de extinção que varia de $\leq 10\%$ acima a $\leq 10\%$ abaixo do ponto de corte. Se os resultados da repetição dos testes de uma amostra de fezes recém preparada estão dentro da zona cinza novamente, a amostra deve ser considerada limítrofe.

As amostras que estiverem mais do que 10 % abaixo do limite calculado devem ser consideradas negativas.

12 Limitações do método

O teste RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH detecta a glutamato desidrogenase específica para *Clostridium difficile* em amostras de fezes. Não é possível associar o nível de extinção determinado com a ocorrência ou severidade dos sintomas clínicos. Somente os adicionais necessários RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ELISA devem ser realizados, bem como os sintomas clínicos, permitem que o CDI seja diagnosticado com alta certeza.

Um resultado positivo não exclui a presença de outros patógenos ou causas infecciosas.

Um resultado negativo não descarta a possibilidade de uma infecção por *C. difficile*. Tal resultado pode ser devido à excreção intermitente do patógeno, ou a quantidade de antígeno na amostra pode ser muito pequena. Se o histórico do paciente confirmar uma suspeita de CDI, outra amostra de fezes deve ser testada.

Um resultado limítrofe pode ser devido à distribuição não-homogênea dos antígenos na amostra de fezes. Nesse caso, uma segunda suspensão da mesma amostra deve ser testada ou outra amostra de fezes deve ser solicitada para teste.

13 Características de desempenho

13.1 Qualidade do teste

Um estudo de validação retrospectivo com o RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA examinou 92 amostras de fezes. As amostras descongeladas foram homogeneizadas e testadas em uma comparação dos RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA e outro ELISA. O resultado do estudo está resumido na Tabela 3.

Tabela 3: Comparação do RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA com outro ELISA

		ELISA Concorrente	
		+	-
RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH	+	30	7
	-	0	55

Correspondência positiva: 89,6 %

Correspondência negativa: 94,0 %

13.2 Sensibilidade analítica

Para determinar a sensibilidade analítica do RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA, o limite de vazão (LoB) foi determinado usando 90 ensaios de amostras negativas de fezes. O limite de detecção (LoD) foi então determinado utilizando 72 ensaios de uma proteína recombinante de glutamato desidrogenase. Os resultados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados de sensibilidade analítica para o RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA

	VM [OD 450/620]	ng/mL
LoB	0,018	-
LoD	-	0,024

13.3. Reatividade cruzada

Uma variedade de microrganismos patogênicos do trato intestinal foi examinada usando o teste RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA e não demonstrou reatividade cruzada. Esses estudos foram realizados com suspensões bacterianas que mostraram concentrações de 10^6 to 10^9 organismos por ml. Amostras de fezes e sobrenadantes de cultura de vírus estão adequadamente listados. Os resultados desse estudo estão listados na Tabela 5.

Tab. 5: Reatividade cruzada com micro-organismos patogênicos

Organismo	Origem	VM [OD 450/620]
Adenovírus	Sobrenadante da cultura	-0,010
Aeromonas hydrophila	Cultura	-0,010
Astrovírus	Sobrenadante da cultura	-0,006
Bacillus cereus	Cultura	-0,012
Bacteroides fragilis	Cultura	-0,004
Campylobacter coli	Cultura	-0,008
Campylobacter jejuni	Cultura	-0,011
Candida albicans	Cultura	-0,007
Citrobacter freundii	Cultura	-0,006
Clostridium bifermentans	Cultura	-0,004
Clostridium difficile	Cultura	3,472
Clostridium novyi	Cultura	-0,007
Clostridium perfringens	Cultura	-0,007
Clostridium sordellii	Cultura	-0,009
Clostridium sporogenes	Cultura	-0,011
Cryptosporidium muris	Cultura	-0,005
Cryptosporidium parvum	Cultura	-0,010
E. coli (O157:H7)	Cultura	-0,006
E. coli (O26:H-)	Cultura	-0,006
E. coli (O6)	Cultura	-0,001
Entamoeba histolytica	Fezes	-0,001
Enterobacter cloacae	Cultura	-0,001
Enterococcus faecalis	Cultura	-0,004
Giardia lamblia	Fezes	0,001
Klebsiella oxytoca	Cultura	-0,005
Norovirus Ag Vírus do Escudo do Deserto	Cápside	-0,004
Norovirus Ag Vírus do Havaí	Cápside	-0,004
Norovirus Ag md 14S	Cápside	-0,008
Norovirus Ag Vírus de Norwalk	Cápside	0,000
Norovirus Ag Vírus da Montanha de Neve	Cápside	-0,001
Norovirus Ag Vírus de Toronto	Cápside	-0,005

Organismo	Origem	VM [OD 450/620]
Proteus vulgaris	Cultura	-0,009
Pseudomonas aeruginosa	Cultura	-0,015
Rotavírus	Sobrenadante da cultura	-0,011
Salmonella enteritidis	Cultura	-0,004
Salmonella typhimurium	Cultura	-0,005
Serratia liquefaciens	Cultura	-0,006
Shigella flexneri	Cultura	-0,005
Staphylococcus aureus	Cultura	-0,009
Staphylococcus epidermidis	Cultura	-0,012
Vibrio parahaemolyticus	Cultura	-0,009
Yersinia enterocolitica	Cultura	-0,007

13.4 Precisão

A reprodutibilidade do RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA foi testada usando seis referências, representando a faixa de medição completa de negativo ao alto positivo. Para determinar a reprodutibilidade entre ensaios, 40 réplicas dessas referências foram testadas. Os valores médios e os coeficientes de variação (CV) foram determinados para três lotes. Para a reprodutibilidade entre ensaios, as referências de 10 diferentes dias de trabalho foram examinadas em duplicatas, com 2 execuções por dia. As medições foram determinadas em 3 lotes por 4 técnicos. A reprodutibilidade entre lotes foi determinada para todos os 3 lotes. Os resultados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados de reproducibilidade/precisão para o RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA

Referências	Valor médio / CV	Intraensaio			Entre-ensaio			Entre-lote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1–3 do kit
1	VM	2,333	2,192	2,438	2,504	2,411	2,376	2,430
	CV (%)	8,10 %	6,71 %	4,23 %	5,65 %	7,84 %	8,14 %	7,59 %
2	VM	1,804	1,593	1,741	1,935	1,907	1,871	1,904
	CV (%)	5,24 %	6,73 %	5,34 %	6,82 %	9,26 %	9,29 %	8,51 %
3	VM	1,477	1,312	1,436	1,531	1,561	1,481	1,525
	CV (%)	7,74 %	8,91 %	6,88 %	7,91 %	10,95 %	9,64 %	9,76 %
4	VM	1,125	0,888	0,951	1,139	1,183	1,117	1,146
	CV (%)	8,25 %	8,24 %	8,55 %	8,05 %	11,49 %	11,55 %	10,67 %
5	VM	0,697	0,590	0,714	0,729	0,776	0,708	0,738
	CV (%)	8,06 %	10,13 %	13,78 %	9,88 %	11,51 %	13,59 %	12,38 %
6	VM	-0,003	-0,003	-0,007	0,008	-0,001	-0,002	0,002
	CV (%)	n/a						

13.5 Substâncias interferentes

As substâncias listadas abaixo não mostraram efeitos nos resultados dos testes quando misturadas com espécimes de fezes negativos e positivos para *C. difficile* nas concentrações descritas:

Mucina	5,0 % w/w	Diclofenaco	0,1 % v/w
Sangue humano	5,0 % v/w	Ciclamato	1,3 % v/w
Sulfato de bário	18,5 % w/w	Metronidazol	3,0 % w/w
Loperamida	0,02 % w/w	Hemoglobina	5,0 % v/w
Pepto-Bismol	6,3 % v/w	Vancomicina	3,0 % w/w
Ácido esteárico/ ácido palmítico	40 % w/w (1:1)		

14 Histórico de versões

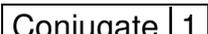
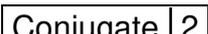
Número da versão	Seção e designação
2017-04-20	Versão anterior
2020-02-18	Revisão geral 2 Sumário e explicação do teste 4 Reagentes fornecidos 5 Instruções de armazenamento 8 Coleta e armazenamento de amostras 9.2 Preparação do tampão de lavagem 9.5 Lavagem 9.8 Terceira incubação 10 Controle de qualidade - indicação de instabilidade ou deterioração de reagentes 11 Avaliação e interpretação 13 Características de desempenho 15 Explicação dos símbolos 16 Referências

15 Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Respeitar as instruções de utilização
	Número de lote
	Válido até
	Temperatura de conservação
	Referência do produto
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos de teste

	Placa de microtitulação
	Tampão de diluição de amostras 1
	Tampão de lavagem
	Controle positivo
	Controle negativo
	Conjugado 1
	Conjugado 2
	Substrato
	Reagente bloqueador

16. Referências

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. Cefai, C. et al.: Gastrointestinal carriage rate of Clostridium difficile in elderly, chronic care hospital patients. J. Hosp. Infect. (1988); 11: 335-339.
8. 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.
9. Voth, D.E., Ballard, J.: Clostridium difficile toxins: Mechanism of action and role in disease. J.Clin. Microbiol. (2005); 18: 247-263.
10. 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.
11. Mc.Donald, L.C. et al.: An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. N.Engl.J.Med. (2005); 353: 23.
12. 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
13. Bartlett, J.G. , Gerding, D.N.: Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. CID (2008); 46(Suppl. 1): 12-18.
14. Kufelnicka, A.M. , Kirn, T.J.: Effective utilization of evolving methods for laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection. Clin.Infect. Dis. (2011)52: 1451-1457
15. Riggs, M.S.A. et al.: Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic Clostridium difficile strains among long-term care facility residents. Clin. Infect. Dis.(2007)45:992-998
16. Lawson, P.A., et al.: Reclassification of Clostridium difficile as Clostridioides difficile (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. Anaerobe (2016)40: 95-9
17. Oren, A. , Rupnik M.: Clostridium difficile and Clostridioides difficile: Two validly published and correct names. Anaerobe (2018)52:125-126.