

RIDA® QUICK Clostridium difficile Toxin A/B

REF N0803



1. Uso previsto

Para utilização em diagnóstico *in vitro*. RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B é um teste imunocromatográfico de detecção rápida para a detecção qualitativa de toxinas A e B de *Clostridium difficile* em amostras de fezes e sobrenadantes de cultura.

2. Sumário e explicação do teste

As doenças diarreicas são um efeito colateral relativamente comum das terapias com antibióticos. Particularmente desde a introdução da clindamicina no início dos anos 70, tem havido uma maior incidência de formas mais graves da doença que se manifestam em colite pseudomembranosa (PMC) em escala maciça. Esta diarreia associada a antibióticos (AAD) é causada principalmente por *Clostridium difficile* e, por isso, é designada diarreia associada a *Clostridium difficile* (CDAD). É uma das formas mais comuns de infecções nosocomiais nos países desenvolvidos. A taxa de portadores em pacientes hospitalizados aumentou, entretanto, para 16% a 35%. Agora identificamos cepas com virulência crescente devido a mecanismos específicos de patogenicidade que tornaram a infecção por *Clostridium difficile* (CDI) um fator de custo significativo na assistência à saúde. A produção das toxinas A e B por cepas toxigênicas de *Clostridium difficile* desempenha um papel significativo na manifestação clínica da doença. Estas proteínas de toxinas de alto peso molecular de cerca de 300 kDa cada são imunológica e funcionalmente distinguíveis. A toxina A é uma enterotoxina, a toxina B uma citotoxina. Ambas as toxinas agem por conta própria, mas também sinergicamente. Como algumas cepas de *Clostridium difficile* não produzem toxinas e cerca de 2% a 8% dos adultos saudáveis e até 80% das crianças menores de dois anos de idade podem ser infectados com *Clostridium difficile*, é muito importante para o diagnóstico e decisão de tratamento a detecção principalmente das toxinas A e B em amostras de fezes em conjunto com a ocorrência de CDAD.

RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B é um teste de detecção rápido usado para a detecção específica da toxina A e da toxina B simultaneamente em amostras de fezes de pacientes que usam anticorpos **monoclonais**. Resultados confiáveis do teste estão disponíveis após apenas 15 minutos, tornando possível iniciar medidas terapêuticas eficazes em um estágio inicial.

3. Princípio do teste

O presente teste de detecção rápido é um teste de fluxo lateral imunocromatográfico de estágio único, que utiliza tanto anticorpos antitoxina A e antitoxina B marcado em dourado como biotinilados. Assim que as toxinas A e/ou B de *Clostridium difficile* estão presentes em uma amostra positiva, os complexos imunes se formam com os anticorpos antitoxina A e antitoxina B marcados, que então passam através da

membrana. A estreptavidina localizada na linha de teste T liga os complexos imunes circulantes através da biotina acoplados aos anticorpos antitoxina A e antitoxina B e, portanto, causando uma coloração vermelho-violeta da linha T. Os anticorpos marcados em ouro não complexados contínuos que circulam são ligados à linha de controle C seguinte. No caso de amostras negativas, os complexos imunes marcados com ouro se ligam apenas à linha C e não à linha T. A linha C vermelha sempre mostra se o processo de teste foi válido.

4. Reagentes fornecidos

Os reagentes no kit são suficientes para 25 determinações.

Tabela 1: Reagentes fornecidos

Cassette	25 exames	25 bandejas de teste embaladas individualmente
Reagent A	13,5 ml	Anticorpos específicos antitoxina A e antitoxina B (camundongo); contém 0,05% de azida sódica, pronta para uso, de cor azul
Reagent B	13,5 ml	Anticorpos específicos antitoxina A e antitoxina B (camundongo); contém 0,05% de azida sódica, pronta para uso, de cor amarela
Pipet	25 peças	Embalagem com 25 pipetas descartáveis
Reagent vial	25 peças	Embalagem com 25 tubos de ensaio
Pipet Tip	25 peças	Saco com 25 pontas de pipeta
Microlit Pipet	1 peça	Pipeta para volume de 150 µl

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.biopharm.com.

5. Instruções de armazenamento

A embalagem pode ser armazenada em temperaturas entre 2 a 25 °C e pode ser utilizada até a data de validade impressa. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término do prazo de validade. Similarmente, a possibilidade de uso das bandejas não pode ser garantida, se a embalagem das bandejas estiver danificada.

6. Reagentes necessários mas não fornecidos

6.1 Reagentes necessários

Não são necessários reagentes adicionais para realizar esse teste.

6.2 Equipamento laboratorial necessário

Os seguintes equipamentos são necessários para realizar esse teste:

Equipamentos
Misturador vórtice (opcional)
Recipiente de descarte com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%

7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Apenas para 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 uso para a realização desse teste. Não despeje amostras ou reagentes usando sua boca. **Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.** Utilize **equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança)** ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste. Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas.

Consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDSs) em www.r-biopharm.com, para obter mais detalhes.

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.

Os reagentes contêm 0,05% de azida sódica como conservante. Não se deve permitir que essa substância entre em contato com a pele ou com membranas mucosas.

Todos os reagentes e materiais que entrarem em contato com amostras potencialmente infecciosas devem ser tratados da mesma forma que as amostras infecciosas, com os desinfetantes adequados (por exemplo, hipoclorito de sódio) ou submetidos à autoclavagem a uma temperatura de 121 °C por pelo menos uma hora.

8. Coleta e armazenamento de amostra

As amostras de fezes devem ser coletadas em recipientes limpos sem aditivos e armazenadas entre 2 e 8 °C antes do início do teste. Se armazenada por mais de três dias, a amostra deve ser congelada a -20 °C (Tabela 2). Neste caso, a amostra é totalmente descongelada e levada à temperatura ambiente antes do teste. Evite congelar e descongelar repetidamente a amostra.

Se forem utilizados esfregaços fecais, certifique-se de que a quantidade do material fecal seja suficiente (aproximadamente 50 mg) para o teste.

Tabela 2: Armazenamento de amostras

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

9. Realização do teste

9.1 Informações gerais

As amostras, os reagentes e as bandejas de teste devem estar em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C) antes do uso. As bandejas de teste não devem ser retiradas da embalagem exterior até pouco tempo antes do uso. Uma vez utilizadas, as bandejas não devem ser reutilizadas. Não realize o procedimento de teste em contato direto com a luz solar. Não devolva o excesso de reagente para os frascos, porque pode resultar em contaminação.

9.2 Preparação para o teste de amostra

Transfira **0,5 ml** (cerca de 12 a 14 gotas) de cada reagente A [Reagent A] e reagente B [Reagent B] em um tubo de ensaio marcado [Reagent vial]. Durante esta etapa, a graduação de 0,5 ml e 1,0 ml no tubo de ensaio tem **precedência**, independentemente do respectivo número de gotas dos reagentes A e B. Os reagentes A e B devem estar na proporção de **1:1**.

9.2.1 Uso de amostras de fezes

Para amostras de fezes **líquidas**, utilize a pipeta descartável [Pipet] para suspender 50 µl (até a segunda protuberância) na mistura de reagentes pré-pipetada. Para amostras de fezes **sólidas**, suspenda cerca de 50 mg da mesma maneira. Em seguida, sele bem o tubo de ensaio e homogeneíze a amostra misturando completamente (ou em vórtice). Posteriormente, a suspensão homogênea precisa repousar por **5 minutos** para permitir que um sobrenadante essencialmente livre de partículas se forme. Para sedimentação, o tubo de ensaio pode ser colocado em uma das aberturas do meio da inserção do reagente.

9.2.1 Uso de culturas líquidas e sólidas de *Clostridium difficile*

Pipete e misture 50 µl de um **caldo nutriente** (por exemplo, caldo tioglicolato) em 1,0 ml da mistura de reagentes preparada anteriormente no tubo de ensaio, consistindo de reagente A (0,5 ml) e reagente B (0,5 ml). Da mistura, 150 µl serão usados para o teste da amostra (Seção 9.3).

Quando **meios de cultura sólidos** são usados, remova tantas colônias quanto possível da placa de meio de cultura e, em seguida, suspenda completamente em 1 ml de água destilada ou solução salina (NaCl a 0,9%). Em seguida, pipetar e misturar 50 µl desta suspensão em 1,0 ml da mistura de reagentes preparada previamente no tubo de ensaio, composta pelo reagente A (0,5 ml) e reagente B (0,5 ml). Da mistura, 150 µl serão usados para o teste da amostra (Seção 9.3).

9.3 Teste da amostra

Remova a bandeja de teste **Cassette** da embalagem e coloque-a em uma superfície plana. Em seguida, coloque uma nova ponta de pipeta **Pipet Tip** na pipeta Microlit **Microlit Pipet** e retire 150 µl do sobrenadante do respectivo tubo de ensaio e pipete para a área de aplicação da bandeja de teste. Certifique-se de que o líquido possa fluir pela membrana sem dificuldade. Se o teste for realizado corretamente, a faixa de controle aparece na linha de controle C após aproximadamente 3 minutos. Se a linha de controle não for visível após 3 minutos, uma amostra recém-preparada precisará ser mais bem sedimentada (opcionalmente, por centrifugação de 2 minutos para 2.000 g) e pipetada na área de aplicação de uma nova bandeja de teste.

Aguarde sempre **15 minutos** para ler o resultado do teste. A coloração das faixas e sua intensidade podem mudar de vermelho-violeta para azul-violeta para cinza-violeta durante toda a fase de desenvolvimento e após a faixa ter secado.

10. Controle de qualidade – indicação de instabilidade ou expiração de reagentes

O teste deve ser avaliado apenas se a bandeja de teste estiver intacta antes de pipetar a suspensão de amostra e não forem vistas mudanças na cor ou nas faixas. Além disso, após o período de incubação de 15 minutos, pelo menos a faixa de controle vermelho-violeta deve estar visível. Se não aparecerem, verifique os seguintes itens antes de repetir o teste:

- A data de validade das bandejas de teste e dos reagentes utilizados
- Realização correta do teste
- Contaminação dos reagentes

Se a faixa de controle ainda não estiver visível após repetir o teste com uma bandeja de teste diferente, entre em contato com o fabricante ou com o distribuidor local da R-Biopharm.

11. Avaliação e interpretação

Devem aparecer no máximo duas faixas, vistas a partir do campo de aplicação da amostra, na seguinte sequência: Uma faixa de reação vermelho-violeta na linha de teste T e uma faixa de controle vermelho-violeta na linha de controle C. **Se a faixa de controle estiver ausente, o teste não pode ser avaliado e é inválido!**

São possíveis as seguintes interpretações:

- **Toxina de *Clostridium-difficile* positiva:** ambas as faixas são visíveis.
- **Toxina de *Clostridium difficile* negativa:** apenas a faixa de controle é visível.
- **Inválido:** não existem faixas visíveis ou existe outra constelação além da mencionada acima. Similarmente, a descoloração das faixas que aparece muito depois dos 15 minutos não tem valor de diagnóstico e não deve ser avaliada.

12. Limitações do método

RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B detecta a toxina A e/ou B de *Clostridium difficile* em amostras de fezes ou em culturas de *C. difficile* após enriquecimento. Não é possível associar a intensidade das faixas específicas visíveis com a ocorrência ou severidade dos sintomas clínicos. **Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com os sintomas clínicos como um todo.**

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

Um resultado **negativo** não descarta a possibilidade de uma infecção por *Clostridium difficile*. Tal resultado pode ser devido à excreção intermitente do patógeno específico ou devido a uma quantidade insuficiente de toxina na amostra. Se o histórico do paciente sustentar uma suspeita de infecção com o patógeno-alvo, o exame deve ser repetido com outra amostra de fezes do paciente.

Um excesso de amostra de fezes pode fazer com que a faixa de teste adquira uma cor marrom sobre a coloração vermelho-violeta da faixa de teste específica. Nesses casos, o teste precisa ser repetido com uma quantidade menor de fezes ou uma suspensão que seja melhor sedimentada por centrifugação para determinar se as toxinas suspeitas de *Clostridium difficile* estão realmente presentes na amostra, mas foram sobrepostas pela matriz excessiva de fezes usada.

13. Características de desempenho

13.1 Sensibilidade clínica e especificidade

RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B foi comparado com dois ensaios de fluxo lateral disponíveis comercialmente. Para a comparação, 61 amostras de fezes foram analisadas com os três ensaios. Os resultados são resumidos na Tabela 3.

Tabela 3: Desempenho clínico de RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B

		Ensaio 1		Ensaio 2	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B	Positivo	35	0	35	0
	Negativo	4	22	0	26

Correspondência positiva: 94,6% 100%
Correspondência negativa: 91,7% 100%

13.2 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do teste de detecção rápido RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B foi determinada diluindo concentrações definidas de toxinas A e B puras em série. Esta série de diluições foi usada para determinar um limite de detecção (LoD) provisório que foi verificado por 30 medições usando o LoD provisório. Os resultados são resumidos na Tabela 4.

Tabela 4: Sensibilidade analítica de RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B

Concentração de toxina Toxina A [ng/ml]	RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B		Concentração de toxina Toxina B [ng/ml]	RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B	
	Lote 1	Lote 2		Lote 1	Lote 2
8,00	Positivo	Positivo	4,00	Positivo	Positivo
7,00	Positivo	Positivo	3,00	Positivo	Positivo
6,00	Positivo	Positivo	2,00	Positivo	Positivo
5,00	Positivo	Positivo	1,00	Negativo	Positivo
4,00	Positivo	Negativo	0,50	Positivo	Negativo
3,00	Negativo	Negativo	0,25	Positivo	Negativo
2,00	Negativo	Negativo	0,13	Negativo	Negativo
1,00	Negativo	Negativo	0,06	Negativo	Negativo
0,50	Negativo	Negativo	0,03	Negativo	Negativo
0,25	Negativo	Negativo	0,02	Negativo	Negativo

De acordo com as medições para verificação, o LoD de RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B foi determinado como 5 ng/ml para a toxina A e 2 ng/ml para a toxina B na amostra. Portanto, o LoD da mistura de reação preparada, que é uma diluição de 1:21 da amostra no reagente A e no reagente B, é de 0,24 ng/ml para a toxina A e 0,10 ng/ml para a toxina B.

13.3. Precisão

A precisão do ensaio RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B foi determinada examinando a precisão intraensaio, a precisão interdia, a precisão interoperador e a precisão interlote. Para cada teste, cinco referências foram medidas: uma negativa, duas fracamente positivas (toxina A e B), e duas moderadamente positivas (toxina A e B).

13.3.1 Precisão intraensaio

A precisão intraensaio foi determinada tendo um operador medindo as cinco referências em dez réplicas cada. RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B mostrou 100% de precisão intraensaio.

13.3.2 Precisão interdia

A precisão interdia foi determinada tendo dois operadores medindo as cinco referências em triplicado em dez dias diferentes. A precisão interdia foi de 100% para todas as referências positivas e 93% para todas as referências negativas, o que está dentro de um limite aceitável.

13.3.3 Precisão interoperador

A precisão interoperador foi realizada por dois operadores no escopo da precisão interdia. O ensaio forneceu resultados reproduzíveis entre diferentes operadores (ver 13.3.2).

13.3.4 Precisão interlote

Cada uma das cinco referências foi analisada pelo mesmo operador em triplicado em três lotes de kits. A precisão interlote foi de 100%.

13.4. Reatividade cruzada

Uma variedade de micro-organismos patogênicos do trato intestinal foram examinados usando o ensaio RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B e, além de *Staphylococcus aureus*, eles não demonstraram reatividade cruzada. Esses testes foram realizados usando suspensões bacterianas (10^7 a 10^9 CFU/ml), culturas de parasitas (10^7 a 10^9 organismos/ml), sobrenadantes de cultura de células infectadas por vírus e uma amostra de fezes. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Reatividade cruzada de RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B

Organismo	Origem	Resultado
<i>Adenovirus</i>	Sobrenadante de cultura celular	Negativo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cultura	Negativo
<i>Astrovirus</i>	Sobrenadante de cultura celular	Negativo
<i>Bacillus cereus</i>	Cultura	Negativo
<i>Bacteroides fragilis</i>	Cultura	Negativo
<i>Campylobacter coli</i>	Cultura	Negativo
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultura	Negativo
<i>Candida albicans</i>	Cultura	Negativo
<i>Citrobacter freundii</i>	Cultura	Negativo
<i>Clostridium difficile</i>	Cultura	Negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	Cultura	Negativo
<i>Clostridium sordellii</i>	Cultura	Negativo
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cultura	Negativo
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Cultura	Negativo
<i>E. coli</i> (O6)	Cultura	Negativo
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Cultura	Negativo
<i>Entamoeba</i>	Material de controle positivo	Negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cultura	Negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultura	Negativo
<i>Giardia lamblia</i>	Amostra de fezes	Negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultura	Negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultura	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	Negativo
<i>Rotavirus</i>	Sobrenadante de cultura celular	Negativo
<i>Salmonella enteritidis</i>	Cultura	Negativo
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cultura	Negativo
<i>Serratia liquefaciens</i>	Cultura	Negativo
<i>Shigella flexneri</i>	Cultura	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura	Positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultura	Negativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cultura	Negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cultura	Negativo

13.5 Substâncias interferentes

As substâncias listadas abaixo não tiveram efeito nos resultados dos testes quando misturadas com amostras de fezes negativas e positivas à toxina A/B de *Clostridium difficile* nas concentrações descritas:

Loperamida	0,02% (p/p)	Sulfato de bário	18,5% (p/p)
Pepto-Bismol	6,3% (v/p)	Ciclamato	1,3% (v/p)
Sangue humano	5% (v/p)		
Ácido esteárico/ ácido palmítico (1:1)	40% (p/p)	Solução de metronidazol a 0,5%	3% (v/p)
Mucina	5% (p/p)	Diclofenaco	0,01% (v/p)
Vancomicina	3% (v/p)		

14. Histórico de versões

Número da versão	Seção e designação
2010-04-20	Versão anterior
2020-08-10	Revisão geral 2. Sumário e explicação do teste 4. Reagentes fornecidos 7. Avisos e medidas preventivas para os usuários 8. Coleta e armazenamento de amostra 13. Características de desempenho

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>
	Respeitar as instruções de utilização
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de conservação
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

	Bandeja de teste
	Reagente A
	Reagente B
	Pipeta descartável
	Tubo de ensaio
	Ponta da pipeta
	Micropipeta

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. 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: Bartlett
15. Mc. Donald, L.C. et al.: An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. N. Engl. J. Med. (2005); 353: 2433-2441.
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: 2442-2449.
17. Bartlett, J.G. , Gerding, D.N.: Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. Clin. Infect. Dis (2008); 46 (Suppl. 1): 12-18.