

RIDA[®] QUICK Clostridium difficile GDH

Art. N°.: N0703



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemanha
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Âmbito de aplicação

Para diagnóstico *in vitro*. O RIDA[®]QUICK Clostridium difficile GDH é um ensaio imunoenzimático para a deteção qualitativa da desidrogenase específica do glutamato de Clostridium difficile em amostras de fezes.

2. Resumo e explicação do teste

O Clostridium difficile, bactéria anaeróbia obrigatória formadora de esporos é parte integrante da flora intestinal saudável dos seres humanos. A taxa de colonização com este agente patogénico relativamente inofensivo, em circunstâncias normais é bastante elevada e, de até 80 % na primeira infância. Esta diminui frequentemente no decurso biológico e atinge uma percentagem média de 2-10 % na idade adulta. Em circunstâncias específicas, como por exemplo hospitalização, esta pode subir levemente acima dos 30 %. Fator determinante para uma infeção provocada por Clostridium difficile (ICD) é a formação das toxinas macromoleculares A (Enterotoxina) e B (Zitotoxina). Uma vez que nem todas as estirpes de Clostridium difficile são produtoras de toxinas, e cerca de 2-8 % dos adultos saudáveis, assim como até 80 % das crianças abaixo dos 2 anos pode estar colonizada com Clostridium difficile, em caso de suspeita de doença diarreica associada ao C. difficile (DACD) a deteção das toxinas A e B é o único procedimento de significado patognomónico. O requisito prévio para tal tem a ver inicialmente com uma colonização bem-sucedida do intestino grosso por meio de formação toxínica suficiente, proveniente de bactérias capacitadas de C.difficile. A colonização é facilitada através da diminuição, em circunstâncias normais, da flora intestinal protetora. Caso esta se encontre destruída, devido por exemplo a antibiose ou outros fatores que possam comprometer a imunidade intestinal, as estirpes de C. difficile em particular, podem-se difundir, e apresentar uma resistência ainda mais ampla ou crescente a diversos antibióticos. Outros fatores de virulência incluem a produção aumentada de toxinas, em caso de deficiências na regulação de algumas estirpes recentemente definidas, as quais tornaram o C. difficile num „reemerging germ“, cuja patogenicidade não se restringe única e exclusivamente a pessoas infetadas por C. difficile (ICD), devido a terapêutica com antibióticos, mas também e cada vez mais a outras pessoas hospitalizadas, e às que não estiveram sobre o efeito de qualquer terapêutica com antibióticos. A importância crescente, principalmente como bactéria nosocomial, levou à abordagem de novas terapêuticas, mas em particular a novos algoritmos em torno do diagnóstico de C.difficile. O objetivo principal é em primeira mão, a deteção de C.difficile, por forma a evitar a sua transmissão a doentes hospitalizados, independentemente de se tratar de uma estirpe de C. difficile toxígena ou não. A desidrogenase do glutamato (GDH) provou ser o marcador de rastreio sensível amplamente eleito de entre muitos outros organismos, devido à elevada disponibilidade de cópias desta enzima. Uma vez que esta enzima também se encontra noutras bactérias intestinais, é de primordial importância que o sistema de deteção registe de forma exata e

altamente sensível a GDH específica do *C.difficile*. O ensaio imunoenzimático RIDASCREEN® *Clostridium difficile* GDH existente, satisfaz ambos os requisitos a um elevado nível. Porém, este não substitui a determinação obrigatória das toxinas A e B associadas à ICD, mas pelo contrário, melhora a segurança do registo desta importante bactéria nosocomial, de forma sequencial, paralela ou anterior ao teste Elisa RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B realizado. Apenas os sintomas específicos da doença e a determinação das toxinas A e B possibilitam o diagnóstico da doença associada à ICD e a consequente decisão em relação à terapêutica adequada.

3. Princípio do teste

O presente teste rápido é um teste de fluxo lateral imunocromático realizado num único estágio, que utiliza tanto anticorpos anti GDH biotinilados como marcados a ouro. Sempre que uma amostra seja positiva relativamente ao *Clostridium difficile* GDH, os anticorpos marcados anti GDH formam imunocomplexos, que passam, de seguida pela membrana. A estreptavidina existente na linha de teste T liga os imunocomplexos afluentes através da biotina acoplada ao anticorpo anti GDH, e causa, por consequência, uma coloração vermelha/roxa da linha T. Na linha de controlo C seguinte ligam-se os anticorpos de passagem sem complexo, marcados a ouro. Nas amostras negativas, por conseguinte, a ligação de imunocomplexos marcados a ouro não se realiza na linha T, mas apenas na linha C. A linha C vermelha indica sempre se a realização do teste foi válida.

4. Conteúdo da embalagem

Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 25 doses

Cassette	25 doses	25 cartuchos de teste embalados individualmente
Reagent A	13,5 ml	Anticorpos anti-GDH específicos; contém 0,05 % de azida, pronto a usar, de cor azul
Reagent B	13,5 ml	Anticorpos anti-GDH específicos; contém 0,05 % azida, pronto a usar, de cor amarela
Pipet	25 unidades	Saco com 25 pipetas de uso único
Reagent vial	25 unidades	Saco com 25 tubos de Eppendorf
Pipet Tip	25 unidades	Saco com 25 pontas para pipeta
Micro Pipette	1 unidade	Pipeta para um volume de 150 µl

5. Reagentes e a sua armazenagem

A embalagem pode ser armazenada a 2 – 25 °C e deve ser usada até ao prazo de

validade impresso. Após expirado o prazo de validade, não pode ser oferecida nenhuma garantia de qualidade. Da mesma forma, também a capacidade de uso dos cartuchos não pode ser garantida, se a embalagem dos mesmos se encontrar danificada.

6. Reagentes adicionais necessários – equipamento necessário

- Misturador Vórtex (opcional)
- Contentor de lixo com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%

7. Medidas de precaução

Apenas para o diagnóstico *in vitro*.

Este teste só deve ser efetuado por pessoal de laboratório qualificado. As diretivas de trabalho nos laboratórios médicos devem ser respeitadas. As instruções de uso para realização dos testes devem ser rigorosamente cumpridas.

Os reagentes contêm azida de sódio como conservante. Deve-se evitar o contacto com a pele ou as mucosas.

Não pipetar as amostras ou reagentes com a boca; evitar o contacto com a pele ferida ou mucosas. Durante o contacto com amostras, devem ser utilizadas luvas de uso único, e após o término dos testes deve-se lavar as mãos. Nas áreas em que se trabalha com amostras ou reagentes de teste não fumar, comer ou beber.

Todos os materiais e reagentes, que tenham entrado em contacto com as amostras potencialmente infecciosas, têm de ser tratados igualmente como as amostras, ou seja, com desinfetantes adequados (p.ex., hipoclorito de sódio) ou autoclavadas pelo menos durante uma hora a 121 °C.

8. Colheita e armazenagem das amostras

As amostras de fezes devem ser colhidas em recipientes limpos sem aditivos e armazenadas antes do teste a 2 – 8 °C. No caso de uma amostra com mais de 3 dias, a amostra deve ser congelada a - 20 °C. Neste caso, a amostra é descongelada totalmente antes do teste e exposta a temperatura ambiente. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido da amostra.

Caso sejam utilizadas colheitas anais, deve-se ter em atenção que o material de fezes deve estar disponível em quantidade suficiente (aprox. 50 mg), para realização do teste.

9. Realização do teste

9.1. Disposições gerais

Todas as amostras, reagentes, assim como os cartuchos de teste, devem ser colocados a temperatura ambiente (20 – 25 °C), antes da sua utilização. Os cartuchos de teste só devem ser retirados da embalagem original, pouco antes da sua utilização. Os cartuchos

de teste não devem ser utilizadas mais do que uma vez. Deve ser evitada a luz direta do sol durante a realização do teste. O reagente restante não deve ser colocado novamente nos tubos de Eppendorf, dado que poderia causar uma contaminação.

9.2. Preparação prévia ao teste das amostras

Num tubo de Eppendorf **Reagent vial** marcado são introduzidos respetivamente **0,5 ml** do Reagente A **Reagent A** e Reagente B **Reagent B** com conta gotas. **Dever-se-á respeitar rigorosamente** a graduação de 0,5 ml e 1,0 ml do tubo Eppendorf. Os reagentes A e B **têm** de estar numa relação de 1 : 1.

9.2.1 Utilização de amostras de fezes

No caso de uma amostra de fezes **liquida**, suspendem-se 50 µl (até à segunda espessura) com a pipeta de uso único **Pipet** na mistura de reagentes apresentada.

Em caso de amostras de fezes **sólidas** são suspensos analogicamente aprox. 50 mg. De seguida, fecha-se hermeticamente o tubo de Eppendorf e a amostra é homogeneizada, por meio de mistura completa (opcionalmente no misturador Vórtex). Seguidamente a suspensão homogénea tem de sedimentar durante **5 minutos**, para que se forme um sobrenadante maioritariamente livre de partículas. Para a sedimentação, o tubo de Eppendorf pode ser colocado numa das três aberturas centrais do encaixe dos reagentes.

9.3. Teste das amostras

O cartucho de teste **Cassette**, retirado da embalagem individual, é depositado numa superfície plana. Em seguida, é colocada uma ponta de pipeta **Pipet Tip** não utilizada na pipeta **Microlit Pipet** e colhidos 150 µl do sobrenadante do respetivo tubo de Eppendorf e pipetado no campo de aplicação do cartucho de teste. Deve-se verificar que o líquido passe sem problemas pela membrana. Em caso de realização correta, a tira de controlo aparece após aprox. 3 minutos na linha de controlo C. Caso a linha de controlo não seja visível após 3 minutos, qualquer nova amostra deve apresentar um grau de sedimentação mais elevado (opcional, através de uma centrifugação de 2 minutos a 2000 g) e ser pipetada no campo de aplicação de um novo cartucho de teste.

O resultado do teste deve ser sempre lido após **15 minutos**. A coloração das bandas pode ser intensificada durante o período completo de reação, e pode-se alterar após a secagem da tira, de vermelho-roxo para azul até cinzento.

10. Controlo de qualidade – Sinais de expiração do reagente

O teste só deve ser avaliado, se o cartucho de teste estiver intacto antes da pipetagem da suspensão das amostras, e o mesmo não apresentar alterações de cor ou tiras visíveis. Além disso, após o período de incubação de 15 minutos, dever ser pelo menos visível a

tira de controlo vermelha/roxa. Se esta não parecer, verifique o seguinte antes de repetir o teste:

- Durabilidade dos cartuchos de teste e dos reagentes utilizados
- Realização correta do teste
- Contaminação dos reagentes

Se após a repetição do teste com um novo cartucho de teste a tira de controlo ainda não for visível, contacte o fabricante ou o seu distribuidor local R-Biopharm.

11. Avaliação e interpretação

Só podem aparecer duas tiras no máximo, vistas do campo de aplicação das amostras, na seguinte sequência: uma tira de reação vermelha/roxa na linha de teste T e uma tira de controlo vermelha/roxa na linha de controlo C. **Se faltar a tira de controlo, o teste não pode ser avaliado e torna-se inválido!**

São possíveis as seguintes interpretações:

- **Clostridium difficile GDH positivo:** ambas as tiras são visíveis.
- **Clostridium difficile GDH negativo:** apenas a tira de controlo é visível.
- **Inválido:** nenhuma tira visível ou configuração diferente da acima referida. Do mesmo modo, as colorações das tiras que só aparecem bastante mais tarde do que após 15 minutos não têm valor diagnóstico e não permitem avaliação.

12. Limites do método

O RIDA[®]QUICK Clostridium difficile GDH deteta a desidrogenase específica do glutamato de Clostridium difficile em amostras de fezes. Em relação entre a intensidade das tiras específicas visíveis e a ocorrência ou gravidade dos sintomas clínicos não pode, no entanto, ser deduzida. **Os resultados alcançados devem ser sempre interpretados em conjunto com o quadro clínico.**

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

Um resultado **negativo** não exclui uma possível infeção com Clostridium difficile. Esta pode ter sido causada por uma eliminação intermitente do agente patogénico ou por quantidade insuficiente de GDH específica na amostra. Se em termos anamnésicos existir suspeita fundamentada de infeção com o agente patogénico procurado, deve ser analisada uma amostra de fezes adicional do paciente.

Uma amostra de fezes em excesso pode causar uma coloração castanha da tira de teste, a qual acaba por cobrir a coloração vermelha/roxa da tira de teste específica. Nestes casos, é necessário fazer um novo teste com uma quantidade menor de fezes, ou uma suspensão de fezes mais apurada, através de centrifugação, a fim de verificar se a

desidrogenase específica do glutamato de Clostridium difficile procurada se encontra na amostra, mas está encoberta pelo excesso de fezes na amostra.

13. Características de desempenho

13.1 Qualidade do teste

Num estudo de validação realizado num total de 80 amostras de fezes congeladas, comparou-se através do RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH a PCR em tempo real (RT-PCR) para os 16 S rDNA do C.difficile e no Elisa para a desidrogenase específica do glutamato de C. difficile. Os resultados são apresentados na tabela abaixo.

Tab.1

Sensibilidade e especificidade do RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH em comparação com a PCR em tempo real (RT) e Elisa

		RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH	
		+	-
RT- PCR / Elisa	+	30	0
	-	1	49

Sensibilidade relativa: 100,0 %

Especificidade relativa: 98,0 %

13.2 Precisão

Para determinar a precisão do teste RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH foram examinadas a reprodutibilidade intra-ensaio (10 repetições / 1 dia / 1 operador / 1 lote), a reprodutibilidade inter-dia (3 repetições / 10 dias / 1 operador / 1 lote), a reprodutibilidade inter-operador (3 réplicas / 1 dia / 3 operadores / 1 lote) e a reprodutibilidade de inter-lotes examinados (3 repetições / 1 dia / 1 operador / 3 lotes). Para cada exame foram medidas 5 referências em réplicas: uma negativa, duas fortemente positivas, duas medianamente positivas. Em 100% das medições o teste RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH obteve o resultado esperado.

13.3 Atividade cruzada

Vários germes patogénicos do trato intestinal foram examinados com o teste rápido RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH e não revelaram atividade cruzada. Os exames foram realizados com suspensões de bactérias (10^5 até 10^9 ufc/ml), com culturas de

parasitas (10^7 até 10^9 organismos/ml), com sobrenadantes de culturas celulares infetadas com vírus e uma amostra de fezes.

Os resultados constam da tabela, apresentada de seguida:

Germe de teste	Origem/fonte	Resultado
Adenovirus	Sobrenadante de cultura de células	negativo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cultura	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 bifermentans</i>	Cultura	negativo
<i>Clostridium difficile</i>	Cultura	positivo
<i>Clostridium novyi</i>	Cultura	negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	Cultura	negativo
<i>Clostridium septicum</i>	Cultura	negativo
<i>Clostridium sordellii</i>	Cultura	negativo
<i>Clostridium sporogenes</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>Enterobacter cloacae</i>	Cultura	negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultura	negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultura	negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultura	negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	negativo
Rotavirus	Sobrenadante de cultura de células	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	negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultura	negativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cultura	negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cultura	negativo

13.4 Substâncias de interferência

As substâncias que a seguir são designadas não mostraram qualquer efeito sobre os resultados dos testes, quando, nas concentrações apresentadas, foram misturadas com amostras de fezes positivas e negativas contaminadas por *Clostridium difficile* GDH:

Sulfato de bário (18,5 % w/w), Loperamida (antidiarreico; 0,02 % w/w), Pepto-Bismol (antidiarreico; 6,3 % v/w), Muzin (5 % w/w), Ciclamato (adoçante artificial 1,3 % v/w), sangue humano (5 % v/w), Ácido esteárico / Ácido palmítico (mistura 1:1, 40 % w/w), Metronidazol (antibiótico; 3 % v/w), Diclofenac (0,1 % v/w), Vancomicina (antibiótico; 3% w/w).

13.5 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica de RIDA[®]QUICK *Clostridium difficile* GDH foi limitada por 2 operadores em 2 lotes do produto, através da realização de uma série de diluições de aprox. 4,6 ng de *Clostridium difficile* GDH / ml amostra. A margem de detecção foi comprovada com 100% de resultados positivos, através de 60 medições ao longo de 5 dias em 2 lotes de 2 operadores com 4,6 ng / ml amostra.

Literatura

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: No.49.
15. Mc.Donald, L.C. et al.: An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. N.Engl.J.Med. (2005); 353: 23.
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: 23.
17. Bartlett, J.G., Gerding, D.N.: Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. CID (2008); 46(Suppl. 1): 12-18.