

RIDA® QUICK Clostridium difficile Toxin A/B

REF N0803



1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B è un test immunocromatografico rapido per la rivelazione qualitativa delle tossine A e B di *Clostridium difficile* nei campioni fecali e in surnatanti da coltura.

2. Sintesi e spiegazione del test

Le affezioni diarroiche costituiscono effetti collaterali relativamente frequenti delle terapie antibiotiche. In particolare, dall'introduzione della clindamicina nei primi anni '70, c'è stata una maggiore incidenza di forme più gravi della malattia che si sono manifestate su vasta scala come colite pseudomembranosa (PMC). Questa diarrea associata agli antibiotici (AAD) è principalmente causata da *Clostridium difficile* ed è quindi chiamata diarrea associata a *Clostridium difficile* (CDAD). È una delle forme più comuni di infezioni nosocomiali nei paesi sviluppati. Il tasso di portatori nei pazienti ospedalizzati è aumentato nel tempo dal 16% al 35%. Ora abbiamo identificato ceppi di virulenza crescente a causa di specifici meccanismi di patogenicità, che hanno reso le infezioni da *Clostridium difficile* (CDI) un fattore di costo significativo nell'assistenza sanitaria. La produzione delle tossine A e B da parte dei ceppi tossigenici di *Clostridium difficile* assume importanza dal punto di vista eziologico per il quadro di manifestazione clinica della patologia. Queste proteine tossiche ad alto peso molecolare di circa 300 kDa ciascuna sono immunologicamente e funzionalmente distinguibili. La tossina A è un'enterotossina, la tossina B una citotossina. Entrambe le tossine agiscono da sole, ma anche sinergicamente. Poiché alcuni ceppi di *Clostridium difficile* non producono tossine e circa il 2% - 8% degli adulti sani e fino all' 80% dei bambini di età inferiore a due anni possono essere infettati da *Clostridium difficile*, per la diagnosi e la decisione di trattamento è soprattutto importante la rivelazione delle tossine A e B nei campioni fecali in combinazione con l'insorgenza di CDAD.

RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B è un test rapido utilizzato per la rivelazione specifica e simultanea della tossina A e della tossina B nei campioni fecali dei pazienti attraverso l'uso di anticorpi **monoclonali**. Risultati affidabili del test sono disponibili già dopo 15 minuti e questo consente di avviare misure terapeutiche efficaci in una fase precoce.

3. Principio del test

Questo test rapido è un test immunocromatografico a fase singola e a flusso laterale, che utilizza anticorpi anti-tossina A e anti-tossina B sia biotinilati sia marcati con particelle d'oro. La presenza di tossine A e/o B di *Clostridium difficile* in un campione positivo determina la formazione di immunocomplessi con gli anticorpi anti-tossina A e anti-tossina B marcati, che poi passano attraverso la membrana. La streptavidina situata sulla linea di positività T lega i complessi immunitari circolanti tramite la biotina accoppiata agli anticorpi anti-tossina A e anti-tossina B, determinando una colorazione

rosso violaceo della linea T. Gli anticorpi continui non complessati marcati con particelle d'oro che passano attraverso sono legati alla successiva linea di controllo C. In caso di campioni negativi, gli immunocomplessi marcati con particelle d'oro si legano solo alla linea C e non alla linea T. La linea C rossa indica sempre se l'esecuzione del test è stata valida.

4. Contenuto della confezione

I reagenti nel kit sono sufficienti per 25 determinazioni.

Tabella 1: Contenuto della confezione

Cassette	25 test	25 cassette confezionate singolarmente
Reagent A	13,5 ml	Anticorpi specifici anti-tossina A e anti-tossina B (murini); contiene lo 0,05% di sodio azide, pronto per l'uso, di colore blu
Reagent B	13,5 ml	Anticorpi specifici anti-tossina A e anti-tossina B (murini); contiene lo 0,05% di sodio azide, pronto per l'uso, di colore giallo
Pipet	25 unità	Busta con 25 pipette monouso
Reagent vial	25 unità	Busta da 25 cuvette di reazione
Pipet Tip	25 unità	Busta con 25 puntali per pipette
Microlit Pipet	1 unità	Pipetta da 150 µl

I materiali pericolosi sono indicati in base ai requisiti di etichettatura. Per ulteriori dettagli consultare le schede dei dati di sicurezza (SDS) su www.biopharm.com.

5. Istruzioni di conservazione

La confezione può essere conservata a 2 - 25 °C e utilizzata fino alla data di scadenza stampata. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida. Analogamente, l'utilizzabilità delle cassette non può più essere garantita se la confezione della cassetta è danneggiata.

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

6.1 Reagenti necessari

Non sono necessari reagenti aggiuntivi per eseguire questo test.

6.2 Attrezzatura di laboratorio necessaria

Per eseguire questo test è necessaria la seguente attrezzatura:

Attrezzatura
Agitatore a vortice (facoltativo)
Contenitore per rifiuti con soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5%

7. Avvertenze e misure precauzionali

Esclusivamente per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Nell'esecuzione del test, attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso. Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. **Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.** Durante **la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti)** e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.

Per ulteriori dettagli consultare le schede dei dati di sicurezza (SDS) su www.r-biopharm.com.

Gli operatori sono responsabili del corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

I reagenti contengono sodio azide allo 0,05% come conservante. Questa sostanza non deve entrare in contatto con la cute o le mucose.

Tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati esattamente come campioni infettivi con adeguati disinfettanti (ad es. ipoclorito di sodio) o sottoposti a sterilizzazione in autoclave per almeno un'ora a 121 °C.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

I campioni fecali devono essere raccolti in contenitori puliti, senza additivi, e conservati prima dell'inizio del test a 2 - 8 °C. Se conservato per più di tre giorni, il campione deve essere congelato a -20 °C (Tabella 2). In questo caso, il campione viene completamente scongelato e portato a temperatura ambiente prima del test. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente il campione.

Se vengono usati strisci rettali, assicurarsi che il volume del materiale fecale sia sufficiente per il test (circa 50 mg).

Tabella 2: Conservazione del campione

Campioni fecali non diluiti	
da 2 a 8 °C	≤ -20 °C
≤ 3 giorni	> 3 giorni

9. Esecuzione del test

9.1 Informazioni generali

I campioni, i reagenti e le cassette del test devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25 °C) prima dell'uso. Le cassette del test devono essere estratte dall'imballaggio esterno solo poco prima dell'uso. Una volta utilizzate, le cassette non devono essere riutilizzate. Non eseguire il test alla luce solare diretta. Non tornare a versare il reagente in eccesso nelle cuvette, perché questo può causare contaminazione.

9.2 Preparazione per il test del campione

Trasferire **0,5 ml** (circa 12 - 14 gocce) ciascuno di reagente A **Reagent A** e di reagente B **Reagent B** in una cuvetta di reazione **Reagent vial** etichettata. Durante questa fase, la tacca di 0,5 ml e 1,0 ml sulla cuvetta di reazione ha la **precedenza** indipendentemente dal numero di gocce dei reagenti A e B. I reagenti A e B devono essere in rapporto **1:1**.

9.2.1 Uso di campioni fecali

Per i campioni fecali **liquidi**, utilizzare la pipetta monouso **Pipet** sospendere 50 µl (fino alla seconda tacca) nella miscela di reagente pre-pipettata.
Per campioni fecali **solidi**, sospendere circa 50 mg allo stesso modo. Quindi, sigillare bene la cuvetta di reazione e omogeneizzare il campione mescolando accuratamente (o agitando tramite vorticazione). Successivamente, la sospensione omogenea deve riposare per **5 minuti** per consentire la formazione di surnatante essenzialmente privo di particelle. Per la sedimentazione, la cuvetta di reazione può essere collocata in una delle aperture centrali dell'inserito per il reagente.

9.2.1 Uso di colture liquide e solide di *Clostridium difficile*

Pipettare e mescolare 50 µl di un **brodo nutriente** (ad es. brodo di tioglicolato) in 1,0 ml della miscela di reagente preparata in precedenza nella cuvetta di reazione, costituita dal reagente A (0,5 ml) e dal reagente B (0,5 ml). Della miscela, 150 µl verranno utilizzati per il test del campione (Sezione 9.3).

Quando si utilizzano **terreni di coltura solidi**, rimuovere il maggior numero possibile di colonie dalla piastra del terreno di coltura e quindi sospendere completamente in 1 ml di acqua distillata o soluzione salina (0,9% NaCl). Successivamente, pipettare e miscelare 50 µl di questa sospensione in 1,0 ml della miscela di reagente preparata in precedenza nella cuvetta di reazione, costituita dal reagente A (0,5 ml) e dal reagente B (0,5 ml). Della miscela, 150 µl verranno utilizzati per il test del campione (Sezione 9.3).

9.3 Test del campione

Estrarre la cassetta del test [Cassette] dall'imballaggio esterno e appoggiarla su una superficie piana. Quindi, posizionare un nuovo puntale per pipetta [Pipet Tip] sulla micropipetta [Microlit Pipet], prelevare 150 µl di surnatante dalla cuvetta di reazione e pipettarlo nell'area di applicazione della cassetta del test. Assicurarsi che il liquido possa fluire attraverso la membrana senza difficoltà. Se il test viene eseguito correttamente, dopo circa 3 minuti la banda di controllo appare sulla linea di controllo C. Se la linea di controllo non è visibile dopo 3 minuti, preparare un nuovo campione, lasciarlo sedimentare meglio (facoltativamente, mediante centrifugazione di 2 minuti per 2.000 g) e pipettarlo nell'area di applicazione di una cassetta nuova. Attendere sempre **da 15 minuti** per leggere il risultato del test. La colorazione delle bande e la loro intensità può variare dal rosso violaceo al blu-violaceo al grigio violaceo durante l'intera fase di sviluppo e dopo l'essiccazione della striscia reattiva.

10. Controllo qualità – Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

Il test dev'essere valutato solo se la cassetta è intatta, prima di pipettare la sospensione del campione e se non sono visibili alterazioni del colore o delle bande. Inoltre, dopo un periodo di incubazione di 15 minuti, devono essere visibili almeno le bande di controllo rosso violacee. Se non compaiono, controllare i seguenti elementi prima di ripetere il test:

- Data di scadenza delle cassette e dei reagenti utilizzati
- Procedura di esecuzione del test corretta
- Contaminazione dei reagenti

Se la banda di controllo continua a non essere visibile dopo aver ripetuto il test usando una nuova cassetta, contattare il produttore o il distributore R-Biopharm locale.

11. Valutazione e interpretazione

Devono comparire al massimo due bande, viste dall'area di applicazione del campione, nella sequenza qui indicata: Una banda di reazione rosso violacea sulla linea di positività T e una banda di controllo rosso violacea sulla linea di controllo C. **Se la banda di controllo non è presente, il test non può essere valutato e non è valido!**

Sono possibili le seguenti interpretazioni:

- **Positivo alla tossina *Clostridium-difficile***: entrambe le bande sono visibili.
- **Negativo alla tossina *Clostridium difficile***: è visibile solo la banda di controllo.
- **Non valido**: non sono visibili bande o l'aspetto generale è diverso da quello sopra menzionato. Analogamente, le alterazioni del colore delle bande che si verificano molto più tardi di 15 minuti non hanno valore diagnostico e non devono essere valutate.

12. Limiti del metodo

RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B rileva la tossina A e/o B di *Clostridium difficile* in campioni fecali o in colture di *C. difficile* dopo l'arricchimento. Non è possibile associare l'intensità delle bande visibili alla presenza o alla gravità dei sintomi clinici. **I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati in combinazione con la sintomatologia clinica nel suo complesso.**

Un risultato **positivo** non esclude la presenza di altri patogeni infettivi o altre cause.

Un risultato negativo non esclude la possibilità di infezione da *Clostridium difficile*. Un risultato simile può essere dovuto a escrezione intermittente dell'agente specifico o a una quantità insufficiente di antigene nel campione. Qualora a livello anamnestico sussista il sospetto di infezione da parte dell'agente patogeno target, l'esame deve essere ripetuto con un altro campione di feci del paziente.

Un eccesso di campione di feci può far assumere alla striscia reattiva un colore brunastro sopra la colorazione rosso-violacea della banda specifica. In questi casi, il test deve essere ripetuto con una quantità minore di feci o con una sospensione meglio sedimentata mediante centrifugazione, per determinare se le tossine sospette di *Clostridium difficile* sono effettivamente presenti nel campione, ma sono state coperte dall'eccesso di matrice fecale utilizzato.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità e specificità clinica

RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B è stato confrontato con due test a flusso laterale disponibili in commercio. Per il confronto, 61 campioni fecali sono stati analizzati con i tre test. I risultati sono riepilogati nella Tabella 3.

Tabella 3: Prestazioni cliniche di RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B

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

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

13.2 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del test rapido RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B è stata determinata diluendo in serie concentrazioni definite di tossine A e B pure. Questa serie di diluizioni è stata utilizzata per determinare un limite di rivelazione (LoD) provvisorio che è stato verificato mediante 30 misurazioni utilizzando il LoD provvisorio. I risultati sono riepilogati nella Tabella 4.

Tabella 4: Sensibilità analitica di RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B

Concentrazione di tossina Tossina A [ng/ml]	RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B		Concentrazione di tossina Tossina B [ng/ml]	RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B	
	Lotto 1	Lotto 2		Lotto 1	Lotto 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

In base alle misurazioni per la verifica, il LoD determinato di RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B era di 5 ng/ml per la tossina A e 2 ng/ml per la tossina B nel campione. Pertanto, il LoD della miscela di reazione preparata, che è una diluizione 1:21 del campione nel reagente A e nel reagente B, è di 0,24 ng/ml per la tossina A e di 0,10 ng/ml per la tossina B.

13.3. Precisione

La precisione del test RIDA[®]QUICK Clostridium difficile Toxin A/B è stata determinata esaminando la precisione intra-analisi, la precisione inter-giorno, la precisione inter-operatore e la precisione inter lotto. Per ogni test, sono stati misurati cinque riferimenti: uno negativo, due debolmente positivi (tossina A e B) e due moderatamente positivi (tossina A e B).

13.3.1 Precisione intra-analisi

La precisione intra-analisi è stata determinata facendo misurare da un operatore i cinque riferimenti in dieci replicati ciascuno. RIDA[®]QUICK Clostridium difficile Toxin A/B ha mostrato una precisione intra-analisi del 100%.

13.3.2 Precisione inter-giorno

La precisione inter-giorno è stata determinata facendo in modo che due operatori misurassero i cinque riferimenti in triplicato in dieci giorni diversi. La precisione inter-giorno era del 100% per tutti i riferimenti positivi e del 93% per tutti i riferimenti negativi, il che è entro un limite accettabile.

13.3.3 Precisione inter-operatore

La precisione inter-operatore è stata determinata da due operatori nell'ambito della precisione inter-giorno. Il test ha fornito risultati riproducibili tra diversi operatori (vedere 13.3.2).

13.3.4 Precisione inter-lotto

I cinque riferimenti sono stati analizzati ciascuno dallo stesso operatore in triplicato in tre lotti di kit. La precisione inter-lotto era del 100%.

13.4. Reattività incrociata

Con il test RIDA[®]QUICK Clostridium difficile Toxin A/B sono stati esaminati diversi microrganismi patogeni del tratto intestinale; a parte lo *Staphylococcus aureus*, non hanno dimostrato alcuna reattività incrociata. Questi test sono stati condotti utilizzando sospensioni batteriche (da 10⁷ a 10⁹ UFC/ml), colture di parassiti (da 10⁷ a 10⁹ organismi/ml), surnatanti di colture cellulari di cellule infettate da virus e un campione di feci. I risultati sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 5: Reattività incrociata di RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B

Organismo	Origine	Risultato
<i>Adenovirus</i>	Surnatante di coltura cellulare	Negativo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Coltura	Negativo
<i>Astrovirus</i>	Surnatante di coltura cellulare	Negativo
<i>Bacillus cereus</i>	Coltura	Negativo
<i>Bacteroides fragilis</i>	Coltura	Negativo
<i>Campylobacter coli</i>	Coltura	Negativo
<i>Campylobacter jejuni</i>	Coltura	Negativo
<i>Candida albicans</i>	Coltura	Negativo
<i>Citrobacter freundii</i>	Coltura	Negativo
<i>Clostridium difficile</i>	Coltura	Negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	Coltura	Negativo
<i>Clostridium sordellii</i>	Coltura	Negativo
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Coltura	Negativo
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Coltura	Negativo
<i>E. coli</i> (O6)	Coltura	Negativo
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Coltura	Negativo
<i>Entamoeba</i>	Materiale di controllo positivo	Negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	Coltura	Negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Coltura	Negativo
<i>Giardia lamblia</i>	Campione di feci	Negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Coltura	Negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	Coltura	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Coltura	Negativo
<i>Rotavirus</i>	Surnatante di coltura cellulare	Negativo
<i>Salmonella enteritidis</i>	Coltura	Negativo
<i>Salmonella typhimurium</i>	Coltura	Negativo
<i>Serratia liquefaciens</i>	Coltura	Negativo
<i>Shigella flexneri</i>	Coltura	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coltura	Positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coltura	Negativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Coltura	Negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Coltura	Negativo

13.5 Sostanze interferenti

Le sostanze elencate di seguito non hanno avuto alcun effetto sui risultati del test quando miscelate in campioni fecali positivi e negativi per la tossina A/B di Clostridium difficile alle concentrazioni specificate:

Loperamide	0,02% (w/w)	Solfato di bario	18,5% (w/w)
Peptobismol	6,3% (v/w)	Ciclamato	1,3% (v/w)
Sangue umano	5% (v/w)		
Acido stearico/acido palmitico (1:1)	40% (w/w)	Metronidazolo soluzione allo 0,5%	3% (v/w)
Mucina	5% (w/w)	Diclofenac	0,01% (v/w)
Vancomicina	3% (v/w)		

14. Cronologia delle versioni

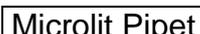
Numero della versione	Sezione e denominazione
2010-04-20	Versione precedente
2020-08-10	Revisione generale 2. Sintesi e spiegazione del test 4. Contenuto della confezione 7. Avvertenze e misure precauzionali 8. Raccolta e conservazione dei campioni 13. Prestazioni e caratteristiche

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Attenersi al manuale operativo
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici del test

	Cassetta del test
	Reagente A
	Reagente B
	Pipetta monouso
	Cuvetta di reazione
	Puntale per pipette
	Micropipetta

16. Bibliografia

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.