

RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B

N.º producto: C0801



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



1. Uso previsto

Para diagnósticos *in vitro*. RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B es un inmunoensayo enzimático para la determinación cualitativa de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* en muestras de heces humanas y de cultivos de cepas de *Clostridium difficile* productoras de las toxinas cultivadas previamente a partir de muestras de heces.

2. Resumen y descripción del ensayo

Las enfermedades diarreicas son un efecto secundario relativamente frecuente de los tratamientos antibióticos. Sobre todo desde la introducción de la clindamicina a principios de los años setenta, se ha observado un incremento en la frecuencia de casos graves de colitis asociada a antibióticos (CAA), con señales y síntomas que pueden evolucionar hasta una colitis pseudomembranosa grave (CPM). Se ha demostrado que el patógeno *Clostridium difficile* causa colitis pseudomembranosa (CPM) y que es una de las causas de CAA y DAA. La producción de las toxinas A y B por cepas toxigénicas de *Clostridium difficile* desempeña una función significativa en la etiología de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Estas proteínas, con masas molares mayores que 200 kDA, presentan diferencias a nivel funcional e inmunológico. La toxina A es una enterotoxina, la toxina B es una citotoxina, y ambas toxinas tienen efectos *in vivo* sinérgicos. Teniendo en cuenta que algunas cepas de *Clostridium difficile* no producen las toxinas y que aproximadamente el 2 – 8 % de los adultos sanos y hasta el 50 % de los niños menores de dos años pueden ser portadores de *Clostridium difficile*, la determinación de estas toxinas parece revestir más importancia a efectos de práctica diagnóstica que para la detección del microorganismo patógeno.

El ELISA RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B es un ensayo inmunoenzimático basado en anticuerpos monoclonales para determinar específicamente y de forma simultánea las toxinas A y B en muestras de heces humanas. En un plazo de dos horas se dispone de resultados de fiables, cosa que permite implementar medidas terapéuticas eficaces en una fase temprana.

3. Principio de ensayo

En el ensayo RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B se utilizan anticuerpos monoclonales según el método tipo sándwich. Estos anticuerpos monoclonales contra las toxinas A y B de *Clostridium difficile* se unen a la superficie de los pocillos de la placa.

Una suspensión de la muestra de heces analizada y las muestras control se pipetea en los pocillos de la placa junto con anticuerpos antitoxinas A/B biotinilados (conjugado 1) y se incuba todo a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Después de un paso de lavado, se añade conjugado de poliperoxidasas y estreptavidina (conjugado 2) y se incuba nuevamente a temperatura ambiente (20 – 25 °C). En las muestras que contienen toxinas, los anticuerpos

inmovilizados, las toxinas y los anticuerpos conjugados forman un complejo tipo sandwich. En el siguiente paso de lavado se elimina el conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina no unido.

En las muestras positivas, la adición de un sustrato provoca que la coloración de la solución con el enzima unido vire de incolora a azul en los pocillos de la placa. La adición de un reactivo de parada provoca que la coloración cambie de azul a amarillo. La extinción es proporcional a la concentración de toxinas A y B en la muestra.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones.

Plate	96	Placa de pocillos, 12 tiras de pocillos (divisibles) en el portatiras; recubiertos con los anticuerpos monoclonales específicos contra las toxinas A y B de <i>Clostridium difficile</i>
Diluent 1	100 ml	Tampón de dilución de muestra, solución salina tamponada con proteína; lista para usar, color azul
Wash	100 ml	Tampón de lavado, solución salina tamponada con fosfato (concentración 10x); contiene timerosal 0,1 %
Control +	2 ml	Control positivo, toxina inactiva, listo para usar
Control -	2 ml	Control negativo (tampón de dilución de muestra), listo para usar
Conjugate 1	13 ml	Anticuerpos conjugados con biotina contra <i>Clostridium difficile</i> toxinas A y B en solución proteica estabilizada; listo para usar, color azul
Conjugate 2	13 ml	Conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina en solución proteica estabilizada, listo para usar, color naranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrógeno/TMB; listo para usar
Stop	12 ml	Reactivo de parada, ácido sulfúrico 1 N, listo para usar

5. Reactivos y almacenamiento

Todos los reactivos deben almacenarse a 2 – 8 °C y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Si se almacena a 2 – 8 °C, el tampón de lavado diluido puede utilizarse durante un periodo máximo de 4 semanas. Evitar la contaminación microbiana. Una vez alcanzada la fecha de caducidad, no es posible garantizar la calidad. Abrir la bolsa de aluminio con tijeras sin que se rompa el precinto de seguridad. Retornar inmediatamente las tiras de pocillos que no se necesiten a la bolsa de aluminio y guardarlas a 2 – 8 °C.

El sustrato incoloro debe protegerse de la luz directa para evitar la descomposición o el viraje a color azul por efecto de la autooxidación. No utilizar el sustrato si ha virado a color azul.

6. Reactivos adicionales y accesorios necesarios

6.1. Reactivos suministrados

- Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

- Tubos de ensayo
- Pipetas desechables (ref. Z0001)
- Mezclador de vórtice (opcional, ver 9.3.)
- Micropipeta de 50 – 100 µl y 1 ml
- Probeta (1.000 ml)
- Cronómetro
- Dispositivo de lavado de placas de pocillos o pipetas multicanal (300 µl)
- Fotómetro para placas de pocillos (450 nm y filtro de referencia de 620 – 650 nm)
- Papel de filtro (toallas desechables)
- Recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito 0,5 %

7. Precauciones para usuarios

Para diagnósticos *in vitro* exclusivamente.

Este ensayo debe realizarlo exclusivamente personal de laboratorio cualificado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Respetar siempre las instrucciones de uso de este ensayo.

No pipetear las muestras y los reactivos con la boca y evitar el contacto con lesiones de la piel y mucosas. Llevar equipo de protección personal (guantes, bata, gafas de protección) al manipular las muestras y lavar las manos después de finalizar el ensayo. No fumar, comer o beber en las zonas en que se procesen las muestras.

Para más información, consultar la hoja de datos de seguridad (MSDS) en www.r-biopharm.com.

El control positivo incluido en el kit contiene toxina de *Clostridium difficile* inactiva que produjo reacción positiva en la prueba de citotoxicidad antes de la inactivación correspondiente. Las toxinas y las muestras de heces deben tratarse como material potencialmente infeccioso y manejarse de acuerdo con lo establecido en las normativas de seguridad nacionales.

El tampón de lavado contiene timerosal 0,1 % como conservante. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel o con las mucosas.

Los reactivos y el material usados deben desecharse de forma correcta y responsable. Respetar la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Las muestras de heces deben obtenerse lo antes posible, pero siempre en el plazo de tres días después de los primeros síntomas de diarrea.

Guardar el material del ensayo a 2 – 8 °C hasta que se vaya a usar. Si el material no puede utilizarse en ensayos hasta dentro de tres días, recomendamos almacenarlo a como mínimo a – 20 °C. No congelar y descongelar la muestra innecesariamente. Después de diluir una muestra de heces en tampón de dilución 1:11, puede almacenarse a 4 °C y utilizarse en un plazo de tres días.

No guardar las muestras de heces en recipientes de transporte que contengan materiales con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes porque pueden interferir con el kit RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B.

En caso de utilizar hisopados rectales, comprobar si el volumen de material fecal es suficiente (aprox. 100 mg) para el ensayo.

La localización de contactos debe incluir muestras de heces de personas contactadas que no presenten síntomas clínicos para poder identificar portadores asintomáticos.

9. Procedimientos de ensayo

9.1. Información general

Los reactivos y pocillos **Plate** deben adquirir temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de la utilización. No sacar las tiras de pocillos de la bolsa de aluminio hasta que hayan alcanzado temperatura ambiente. Mezclar a fondo los reactivos inmediatamente antes de usarlos. Después de usar, almacenar las tiras de pocillos (en bolsas de aluminio) y los reactivos a 2 – 8 °C. Desechar las tiras de pocillos usadas. No utilizar los reactivos y las tiras de pocillos en caso si el envase está dañado o los viales tienen pérdidas.

Para evitar la contaminación cruzada, las muestras no deben entrar en contacto directo con los componentes del kit. No realizar el ensayo en condiciones de luz solar directa. Recomendamos cubrir la placa de pocillos o el precinto con un envoltorio plástico para evitar pérdidas por evaporación.

9.2. Preparación del tampón de lavado

Mezclar 1 parte de tampón de lavado concentrado **Wash** con 9 partes de agua destilada. Calentar previamente el concentrado (en baño maría a 37 °C) para disolver los posibles cristales presentes.

9.3. Preparación de las muestras

Llenar un tubo de ensayo etiquetado con un 1 ml de tampón de dilución de muestra RIDASCREEN® **Diluent | 1**. Utilizar una pipeta desechable (ref. Z0001) para extraer una muestra de heces fluida (aprox. 100 µl) hasta justo por encima de la segunda marca y añadirla al tampón del tubo de ensayo para formar una suspensión. Para formar una suspensión con una muestra de heces sólida, añadir una cantidad equivalente (aprox. 50 – 100 mg) con una espátula o asa de siembra desechable.

Homogeneizar la suspensión de heces mediante aspiración y eyección con una pipeta desechable o mediante agitación en un mezclador de vórtice. Dejar reposar brevemente (10 min.) la suspensión para que sedimenten las partículas de heces gruesas; el sobrenadante clarificado de la suspensión puede usarse directamente en el ensayo. Si el procedimiento de ensayo se realiza en un sistema ELISA automatizado, el sobrenadante **debe** estar libre de partículas. En este caso, es aconsejable centrifugar la muestra a 2.500 G durante 5 minutos.

Nota:

Las muestras de heces diluidas en **Diluent | 1** pueden ensayarse en todos los ELISA RIDASCREEN® para los que se utilice **Diluent | 1**.

9.4. Ensayo de las toxinas de cultivos de *Clostridium difficile*

Para analizar las colonias después de cultivarlas en sustratos sólidos (CCFA o agar Schaedler), utilizar un asa de siembras para retirarlas de la placa de agar; suspender en 1 ml de tampón de dilución de muestra **Diluent | 1** y mezclar bien. En este caso, es aconsejable centrifugar la suspensión (2.500 G durante 5 minutos). El sobrenadante clarificado puede usarse directamente en el ensayo.

Para analizar cultivos líquidos, suspender 100 µl de la muestra en 1 ml del tampón de dilución de muestra **Diluent | 1** y mezclar bien. En este caso, es aconsejable centrifugar la suspensión (2500 G durante 5 minutos). El sobrenadante clarificado puede usarse directamente en el ensayo.

Nota:

Solo es posible determinar la presencia de toxinas en un cultivo de células de Clostridium si ha comenzado la fase de esporulación. La esporulación y la correspondiente excreción de toxinas ocurren únicamente en la fase de crecimiento tardía y estacionaria del patógeno, cuando se han consumido todos los nutrientes.

9.5. Primera incubación

Después de llenar un número suficiente de pocillos del portatiras, añadir 100 µl del **Control | +** , positivo, del **Control | -** negativo o de la suspensión de muestra de heces (o, si está disponible, del sobrenadante de la suspensión de colonias) a los pocillos. Acto seguido, añadir 100 µl del anticuerpo conjugado con biotina **Conjugate | 1** y mezclar (golpeado suavemente contra un lado de la placa); incubar a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 60 minutos.

9.6. Lavado

Es fundamental realizar un lavado exhaustivo si quieren obtenerse resultados correctos y, en consecuencia, deben respetarse rigurosamente los pasos de lavado especificados en las instrucciones. Vaciar las sustancias incubadas en los pocillos en un recipiente de residuos para eliminarlas de acuerdo con la normativa local en materia de eliminación de residuos. Voltar la placa sobre papel absorbente y golpearla suavemente para eliminar los restos de humedad. A continuación, lavar la placa cinco veces con 300 µl de tampón de lavado cada vez. Después de cada paso de lavado, sacudir los pocillos sobre una pieza de papel absorbente seco y limpio para verificar que están completamente vacíos.

Si se utiliza un equipo de limpieza de microplacas o un equipo ELISA automático, comprobar si el equipo está ajustado correctamente; solicitar los ajustes al fabricante, si es preciso.

Los equipos suministrados por R-Biopharm están programados con ajustes y protocolos de trabajo validados. A fin de no bloquear las boquillas de lavado, utilizar solamente suspensiones de heces libres de partículas (ver punto 9.3., Preparación de las muestras). Verificar asimismo que se ha aspirado completamente el líquido en cada paso de lavado.

9.7. Segunda incubación

Pipetear 100 µl de conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina Conjugate 2 en los pocillos e incubar a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 30 min.

9.8. Lavado

Lavar según se ha descrito en el punto 9.6.

9.9. Tercera incubación

Llenar todos los pocillos con 100 µl de sustrato Substrate. Incubar la placa a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 15 minutos en la cámara oscura. A continuación, llenar todos los pocillos con 50 µl de reactivo de parada Stop con objeto de detener la reacción. Después de mezclar con precaución golpeando suavemente contra un lado de la placa, medir la extinción a 450 nm (opcionalmente a 450/620 nm). Ajustar el punto cero en el aire, es decir, sin la placa de pocillos.

Nota:

En las muestras de pacientes con positivo alto pueden formarse precipitados de sustrato de color negro.

9.9 Protocolo de ensayo abreviado

Los tiempos de incubación descritos en los puntos 9.5, 9.7 y 9.9 pueden reducirse significativamente si la placa se incuba a 37 °C con una frecuencia de vibración de 20–25 Hz (DSX®, Fa. Dynex). Los tiempos de incubación varían de la forma siguiente:

1. Incubación 1: 30 min.
2. Incubación 2: 15 min.
3. Incubación 3: 15 min.

Pueden utilizarse asimismo agitadores de microplacas separados como el Thermomixer de Eppendorf (frecuencia ajustada: 850 rpm) o DTS-2 de LTF Labortechnik (frecuencia ajustada: 800 rpm).

10. Control de calidad, información sobre caducidad de reactivos

A efectos de control de calidad, deben utilizarse controles positivos y negativos cada vez que se realice el ensayo con objeto de garantizar que los reactivos son estables y que el ensayo se realiza correctamente. El ensayo se habrá realizado correctamente si la tasa de extinción (O.D.) de control negativo es menor que 0,2 a 450 nm (menor que 0,160 a 450/620 nm) y el valor medido para el control positivo es mayor que 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valor mayor que 0,2 (0,160) para el control negativo puede indicar que el lavado no ha sido suficiente. Las desviaciones de los valores requeridos, como turbidez o coloración azul del sustrato incoloro antes de introducirlo en los pocillos, puede indicar que los reactivos han caducado.

Si no se cumplen los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
- Procedimiento de ensayo correcto
- Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas; no utilizar soluciones de sustrato que hayan virado a color azul.

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consultar al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Cálculo del corte

Con objeto de establecer el corte, se añaden 0,15 unidades de extinción a la extinción medida para el control negativo.

$$\text{Corte} = \text{extinción del control negativo} + 0,15$$

11.2. Resultados del ensayo

La evaluación de la muestra es **positiva** si la tasa de extinción supera en más del 10 % el valor de corte calculado.

La evaluación de la muestra es **marginal** si la tasa de extinción está dentro de un rango 10 % menor a 10 % mayor que el valor de corte. Si la repetición de la prueba de una muestra de heces fresca cae nuevamente dentro de la zona gris, la evaluación de la muestra es negativa.

Las muestras con extinciones inferiores en más del 10 % al valor de corte calculado deben considerarse **negativas**.

12. Limitaciones del método

El ensayo RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B detecta la presencia de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* en muestras de heces. El nivel de extinción determinado no puede asociarse a la presencia o gravedad de los síntomas clínicos. **Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro clínico.**

Un resultado **positivo** no permite descartar la presencia de otros patógenos infecciosos.

Un resultado **negativo** no permite descartar la posibilidad de infección con *Clostridium difficile*.

El resultado puede estar provocado por la descomposición proteolítica de las toxinas en la muestra debido a condiciones de almacenaje indebidas. Si la anamnesis del paciente da pie a sospechar una infección con *Clostridium difficile*, deberá repetirse la prueba con una muestra de heces diferente.

Un resultado **marginal** puede deberse a la distribución no homogénea de las toxinas en la muestra de heces. En este caso, deberá repetirse la prueba con una segunda suspensión de la misma muestra o solicitarse una nueva muestra.

La obtención de resultados negativos para toxinas en un cultivo de *Clostridium difficile* a partir de muestras de heces puede indicar la presencia de cepas no toxigénicas de *Clostridium difficile*. Para validar este resultado, deberá analizarse mediante ELISA la posible producción de toxinas por parte de las colonias sospechosas.

13. Rendimientos

13.1. Calidad del ensayo

En un estudio prospectivo realizado en una importante clínica alemana se analizaron 502 muestras de heces de pacientes con sospecha de DACD (diarrea asociada a *Clostridium difficile*) mediante RIDASCREEN® ELISA y otros productos comerciales ELISA y se correlacionaron con el análisis de citotoxicidad como "patrón oro". El RIDASCREEN® ELISA fue el que mostró la mejor correlación con el patrón oro. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Comparación de RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B con el "patrón oro" (análisis de citotoxicidad con neutralización)

		RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B	
		pos	neg
Patrón oro	pos	61	7
	neg	14	420

Sensibilidad:	89,7 %
Especificidad:	96,8 %
Valor predictivo positivo:	81,3 %
Valor predictivo negativo:	98,4 %

13.2. Reactividad cruzada

Se analizaron numerosos microorganismos patógenos del tracto intestinal con el ELISA RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B sin que pudiera observarse reactividad cruzada. Estas pruebas se realizaron con suspensiones bacterianas (10^6 a 10^9 ufc/ml), cultivos de parásitos (10^7 a 10^9 organismos/ml) y con sobrenadantes de cultivos de células infectadas con virus. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Reactividad cruzada con microorganismos patógenos del tracto intestinal

Organismo	Resultado [DO 450]
Adenovirus	0,060
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,057
Astrovirus	0,055
<i>Bacillus cereus</i>	0,053
<i>Bacteroides fragilis</i>	0,058
<i>Campylobacter coli</i>	0,061
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,059
<i>Candida albicans</i>	0,066
<i>Citrobacter freundii</i>	0,055
<i>Cryptosporidium muris</i>	0,061
<i>Cryptosporidium parvum</i>	0,054
<i>E. coli</i> (EPEC)	0,060
<i>E. coli</i> (EPEC)	0,054

<i>E. coli</i> (STEC)	0,053
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,059
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,054
<i>Giardia lamblia</i>	0,056
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,054
<i>Proteus vulgaris</i>	0,055
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,055
Rotavirus	0,056
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,063
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,062
<i>Serratia liquefaciens</i>	0,053
<i>Shigella flexneri</i>	0,067
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,065
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,055
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,054
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,053

3.2.1. Especificidad de las cepas:

Las siguientes cepas de *Clostridium* analizadas produjeron resultados negativos en el ELISA RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B: *C. bifermentans*, *C. butyricum*, *C. difficile* no toxigénica (3 cepas), *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. sporogenes*, *C. tetani*.

13.3. Precisión

La reproducibilidad del ELISA RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B se analizó con seis referencias representativas del rango de medida completo, desde negativo a positivo alto. Para determinar la reproducibilidad intraensayo se analizaron 40 réplicas de estas referencias. Se determinaron las medias y los coeficientes de variación (CV) para tres lotes de los kits. Para la reproducibilidad interensayo, se analizaron referencias en forma de duplicados de diez días de trabajo secuenciales, con dos ensayos por día. Las medidas fueron realizadas por tres técnicos sobre tres lotes de los kits. Se determinó la reproducibilidad entre lotes para los tres lotes de kits.

Referencia Media/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
	Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lotes kit 1–3
1	1,181 / 5,09%	1,307 / 6,13%	1,175 / 4,28%	1,256 / 13,93%	1,218 / 12,86%	1,211 / 11,33%	1,228 / 12,78%
2	0,867 / 6,25%	0,895 / 4,59%	0,879 / 4,81%	0,947 / 15,51%	0,900 / 14,41%	0,897 / 12,47%	0,915 / 14,24%
3	0,659 / 6,01%	0,665 / 5,16%	0,616 / 7,61%	0,620 / 17,87%	0,596 / 16,85%	0,601 / 12,45%	0,605 / 15,94%
4	0,428 / 9,64%	0,461 / 4,74%	0,462 / 3,30%	0,471 / 20,13%	0,445 / 18,24%	0,482 / 18,32%	0,466 / 18,98%
5	0,320 / 8,42%	0,337 / 5,69%	0,300 / 4,71%	0,319 / 24,51%	0,293 / 19,98%	0,319 / 14,19%	0,310 / 20,14%
6	0,046 / 5,60%	0,049 / 6,91%	0,053 / 15,40%	0,058 / 24,16%	0,058 / 20,54%	0,059 / 15,37%	0,058 / 20,33%

13.4. Sensibilidad analítica

Los límites de detección analítica de las toxinas A y B de Clostridium difficile se determinaron por separado. El límite del blanco (limit of blank, LoB) se determinó con 270 ensayos de muestras negativas y los límites de detección (limit of detection, LoD) de las toxinas A y B se analizaron en 90 ensayos por toxina. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: LoB y LoD

	DO (450 nm)	Concentración analítica de la muestra (ng/ml)	Concentración analítica en la suspensión de muestra (1+10 en diluyente) (ng/ml)
LoB	0,073	-	-
LoD (toxina A)	0,132	1,56	0,156
LoD (toxina B)	0,117	1,56	0,156

14. Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias no demostraron tener efectos en los resultados del ensayo al mezclarlas con muestras de heces positivas y negativas para toxina A/B de *C.difficile* en las concentraciones descritas: sulfato de bario (5 % p/p), loperamida (antidiarreico; 5 % p/p), Pepto-Bismol (antidiarreico, 5 % v/p), mucinas (5 % p/p), ciclamato de sodio (edulcorante, 5 % v/p), sangre humana (5 % v/p), ácido esteárico/ácido palmítico (mezcla 1:1, 40 % p/p), metronidazol (0,5) (antibiótico 5 % v/p), diclofenaco (0,00263 % v/p).

Anexo

Símbolos específicos del ensayo:

Plate	Placa de pocillos
Diluent 1	Tampón de dilución de muestra
Wash	Tampón de lavado
Control +	Control positivo
Control -	Control negativo
Conjugate 1	Conjugado 1
Conjugate 2	Conjugado 2
Substrate	Sustrato
Stop	Reactivo de parada

Bibliografía

1. Lyster, 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.