

RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B

Codice prodotto: C0801



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Telefono: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Campo di applicazione

Per uso diagnostico *in vitro*. RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B è un test immunoenzimatico per la rilevazione qualitativa delle tossine A e B di *Clostridium difficile* in campioni di feci umane e da colture di ceppi di *Clostridium difficile* che producono tossine, precedentemente rilevati in campioni di feci.

2. Sintesi e spiegazione del test

Le affezioni diarroiche costituiscono effetti collaterali relativamente frequenti delle terapie antibiotiche. In particolare, con l'introduzione della clindamicina all'inizio degli anni '70, si sono verificate forme più gravi e più frequenti di colite associata agli antibiotici (AAC) con segni e sintomi che possono instaurare una colite pseudomembranosa (PMC) massiva. Il *Clostridium difficile* costituisce l'agente patogeno della colite pseudomembranosa (PMC) e rappresenta una delle cause della AAC e AAD. 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 con masse molecolari superiori a 200 kDA sono distinguibili a livello immunologico e funzionale. La tossina A è una enterotossina, la tossina B una citotossina ed entrambe mostrano sinergia nei loro effetti *in vivo*. Dato che alcuni ceppi di *Clostridium difficile* non producono le tossine e che approssimativamente il 2 – 8 % degli adulti sani e fino al 50 % dei bambini di età inferiore a due anni possono essere portatori di *Clostridium difficile*, la rilevazione di queste tossine sembra avere un significato maggiore nella pratica diagnostica rispetto alla rilevazione del microrganismo patogeno.

Il test RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B ELISA è un dosaggio immunoenzimatico che consente la rilevazione specifica simultanea della tossina A e B in campioni di feci di pazienti con l'ausilio di anticorpi monoclonali. Risultati affidabili dell'esame sono disponibili già dopo due ore e questo consente di avviare misure terapeutiche efficaci in una fase precoce.

3. Principio del test

Nel test RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B gli anticorpi monoclonali sono posizionati a sandwich. Questi anticorpi monoclonali alle tossine A e B di *Clostridium difficile* sono legati alla superficie del pozzetto della piastra per microtitolazione.

Una sospensione del campione di feci da esaminare e i controlli vengono introdotti nel pozzetto della piastra per microtitolazione insieme ad anticorpi anti-tossina A/B biotinilati (coniugato 1) mediante pipetta a temperatura ambiente (20 – 25 °C) per l'incubazione. Dopo il lavaggio aggiungere il poli-coniugato streptavidina-perossidasi (Coniugato 2) e incubare nuovamente a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Quando viene rilevata presenza di tossine in un campione, si forma un complesso a sandwich composto dagli anticorpi immobilizzati, dalle tossine e dagli anticorpi coniugati. Un altro lavaggio rimuove il poli-coniugato streptavidina-perossidasi non

legato. Nei campioni positivi, l'aggiunta di un substrato modifica l'enzima legato da una soluzione incolore a una soluzione blu nei pozzetti della piastra di microtitolazione. L'aggiunta di un reagente bloccante causa una variazione cromatica da blu a giallo. L'estinzione è proporzionale alla concentrazione delle tossine A e B presenti nel campione.

4. Reagenti forniti

I reagenti nel kit sono sufficienti per 96 determinazioni.

Plate	96	Piastra per microtitolazione, 12 strisce di micropozzetti (divisibili) in telaio di fissaggio, rivestita con anticorpi monoclonali specifici per le tossine A e B del <i>Clostridium difficile</i>
Diluent 1	100 ml	Tampone di diluizione dei campioni, soluzione proteica tamponata NaCl; pronto per l'uso, colorazione in blu
Wash	100 ml	Tampone di lavaggio, soluzione tamponata al fosfato NaCl (concentrata 10 volte); contiene 0,1% di Thimerosal
Control +	2 ml	Controllo positivo; tossina inattivata, pronto per l'uso
Control -	2 ml	Controllo negativo (tampone di diluizione dei campioni); pronto per l'uso
Conjugate 1	13 ml	Anticorpi biotina-coniugati alle tossine A e B di <i>Clostridium difficile</i> in soluzione proteica stabilizzata; pronti per l'uso; colorati in blu
Conjugate 2	13 ml	Poli-coniugato streptavidina-perossidasi in soluzione proteica tamponata; pronto per l'uso; colorato in arancione
Substrate	13 ml	Perossido di idrogeno/TMB; pronto per l'uso
Stop	12 ml	Reagente di bloccaggio; acido solforico 1 N; pronto per l'uso

5. Reagenti e loro conservazione

Tutti i reagenti devono essere conservati a 2 – 8 °C e possono essere utilizzati fino alla data stampata sull'etichetta. Il tampone di lavaggio diluito è conservabile per 4 settimane ad una temperatura compresa tra 2 – 8 °C. Evitare la contaminazione microbica.

Dopo la data di scadenza, non può essere più fornita alcuna garanzia di qualità.

La busta in alluminio deve essere aperta con le forbici, in modo tale da non rimuovere la chiusura a clip. Le strisce di microtitolazione inutilizzate devono essere immediatamente riposte nella busta in alluminio e conservate a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.

Evitare l'esposizione diretta alla luce del substrato incolore, per evitare la decomposizione o la colorazione blu per auto-ossidazione. Un substrato che sia diventato blu non deve essere utilizzato.

6. Reagenti aggiuntivi necessari – attrezzatura richiesta

6.1. Reagenti forniti

- Acqua distillata o deionizzata

6.2. Attrezzatura

- Provette
- Pipette monouso (Codice prodotto Z0001)
- Vorticatore (opzionale, vedere Punto 9.3.)
- Micropipetta da 50 – 100 µl e 1 ml in volume
- Cilindro graduato (1.000 ml)
- Cronometro
- Dispositivo di lavaggio per piastre per microtitolazione o pipette multicanale (300 µl)
- Fotometro per piastre per microtitolazione (450 nm e filtro di riferimento 620–650 nm)
- Carta filtrante (carta da laboratorio)
- Contenitore di rifiuti con soluzione di ipoclorito allo 0,5 %

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso nell'esecuzione del test.

Non introdurre con la bocca campioni o reagenti mediante pipetta, evitare il contatto con la cute lesa o con le mucose. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e lavare le mani dopo aver eseguito il test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

Per maggiori informazioni consultare la Scheda di sicurezza dei materiali (MSDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

Il controllo positivo incluso nel kit contiene tossina di *Clostridium difficile* inattivata che ha evidenziato una reazione positiva prima dell'inattivazione nel test di citotossicità. I campioni di tossine e feci devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo e maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.

Il tampone di lavaggio contiene 0,1 % di Thimerosal come conservante. Questa sostanza non deve entrare in contatto con la cute o le membrane mucose.

Garantire uno smaltimento idoneo e responsabile di tutti i reagenti e i materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

I campioni di feci devono essere raccolti il più presto possibile e comunque entro tre giorni dopo la comparsa dei sintomi iniziali di diarrea.

Fino all'uso, conservare il materiale di test a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Qualora il materiale non possa essere utilizzato per un test entro tre giorni, si raccomanda di conservarlo a una temperatura di -20 °C o inferiore. Evitare il ripetuto congelamento e scongelamento del campione. Dopo la diluizione in tampone 1:11, il campione può essere conservato a 4 °C e dovrà essere utilizzato entro tre giorni.

I campioni di feci non devono essere raccolti in contenitori per il trasporto che contengano mezzi di trasporto come conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti e detergenti, in quanto potrebbero crearsi interferenze con il test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B.

Se vengono usati tamponi rettali, assicurarsi che il volume del materiale fecale sia sufficiente (circa 100 mg) per il test.

Le indagini ambientali devono includere anche campioni di feci prelevati da persone che non mostrano sintomi clinici al fine di identificare i portatori asintomatici.

9. Esecuzione del test

9.1 Informazioni generali

Tutti i reagenti e la piastra di microtitolazione **Plate** devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25 °C) prima dell'uso. Le strisce per microtitolazione devono essere rimosse dalla busta in alluminio solo dopo il raggiungimento della temperatura ambiente. Mescolare con cura i reagenti immediatamente prima dell'utilizzo. Dopo l'uso, conservare le strisce di microtitolazione (poste in buste sigillate) e i reagenti a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Una volta usate, le strisce per microtitolazione non devono essere riutilizzate. I reagenti e le strisce per microtitolazione non devono essere utilizzati se l'imballaggio è danneggiato o i flaconi non sono ermetici.

Evitare il contatto diretto dei campioni con i componenti del kit per evitare la contaminazione incrociata. Il test non deve essere esposto all'irradiazione solare diretta. Si raccomanda di coprire o sigillare con una pellicola in plastica la piastra per microtitolazione per evitare la perdita per evaporazione.

9.2. Preparazione del tampone di lavaggio Miscelare 1 parte di concentrato di tampone di lavaggio **Wash** con 9 parti di acqua distillata. Tutti i cristalli presenti nel concentrato devono essere precedentemente riscaldati (in un bagno d'acqua a 37 °C) per scioglierli.

9.3. Preparazione dei campioni

Prendere una provetta marcata e introdurre 1 ml di tampone per diluizione dei campioni RIDASCREEN® **Diluent|1**. Utilizzare una pipetta monouso (codice prodotto Z0001) per aspirare un campione di feci liquide (circa 100 µl) fino a superare di poco la seconda graduazione e aggiungerlo al tampone nella provetta per ottenere una sospensione. Per realizzare una sospensione con un campione di feci solide, introdurre una quantità equivalente (circa 50–100 mg) con una spatola o un'ansa di inoculazione monouso.

Omogeneizzare la sospensione fecale mediante aspirazione ed espulsione tramite pipetta monouso oppure, in alternativa, miscelare in un vorticatore. Lasciare riposare la sospensione per un breve periodo (10 minuti) affinché le particelle di feci più grandi possano depositarsi, quindi il supernatante di sospensioni di feci purificato è pronto per essere utilizzato direttamente nel test. Se la procedura viene eseguita in un sistema ELISA automatico, il supernatante **non** deve contenere particelle. In questo caso, è consigliabile centrifugare il campione a 2.500 G per 5 minuti.

Nota:

I campioni di feci diluiti in **Diluent|1** possono essere testati in tutti i dosaggi RIDASCREEN® ELISA per cui viene usato **Diluent|1**.

9.4. Test delle tossine ottenute dalle colture di *Clostridium difficile*

Per l'esame delle colonie sottoposte a coltura su substrati solidi (CCFA o Schaedler agar), utilizzare un'ansa di inoculazione per rimuoverle dalla piastra di agar, eseguire la sospensione in 1 ml di tampone di diluizione per campioni **Diluent|1** e miscelare bene. In questo caso, è consigliabile centrifugare la sospensione (2.500 G per 5 minuti). Il supernatante purificato può essere utilizzato direttamente nel test.

Per esaminare colture liquide, sospendere 100 µl di campione in 1 ml di tampone di diluizione del campione **Diluent|1** e miscelare bene. In questo caso, è consigliabile centrifugare la sospensione (2500 G per 5 minuti). Il supernatante purificato può essere utilizzato direttamente nel test.

Nota:

La presenza di tossine in una coltura di cellule di *Clostridium* può essere determinata solo dopo l'inizio della sporulazione. La sporulazione e l'associata escrezione di tossine si verificano solo nella fase tardiva, stazionaria della crescita dell'agente patogeno, quando tutti i nutrienti sono stati consumati.

9.5. Prima incubazione

Dopo aver filtrato un numero sufficiente di pozzetti nel telaio di fissaggio, introdurre nei pozzetti 100 µl di **Control | +** positivo, di **Control | -** negativo o di sospensione di campione di feci (oppure, se disponibile, di supernatante della sospensione di colonia). Quindi aggiungere 100 µl dell'anticorpo biotina-coniugato **Conjugate | 1** e miscelare (dando dei leggeri colpi sul bordo della piastra); successivamente incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.6. Lavaggio

Un accurato lavaggio è importante per ottenere i giusti risultati e deve pertanto essere effettuato in stretta conformità con le istruzioni. Il prodotto di incubazione dei pozzetti deve essere svuotato in un contenitore per rifiuti per poi essere smaltito nel rispetto delle disposizioni locali. Quindi capovolgere la piastra su carta assorbente e picchiettare per rimuovere l'umidità residua. Lavare la piastra cinque volte utilizzando 300 µl di lampone di lavaggio ogni volta. Assicurarsi che i pozzetti vengano completamente svuotati estroflettendoli tamponandoli dopo ciascun lavaggio su un'area di carta assorbente ancora asciutta e inutilizzata.

Se si utilizza una lavatrice per micropiastre o un sistema ELISA completamente automatico, assicurarsi che la macchina sia correttamente regolata e, se necessario, chiedere le impostazioni al produttore.

I dispositivi forniti da R-Biopharm sono già programmati con le impostazioni e i protocolli di lavoro convalidati. Per evitare di bloccare gli aghi di lavaggio, introdurre solo sospensioni di feci prive di particelle (vedere Punto 9.3., Preparazione dei campioni). Inoltre, assicurarsi che tutto il liquido venga aspirato in ogni fase di lavaggio.

9.7. Seconda incubazione

Utilizzare una pipetta per introdurre 100 µl di poli-coniugato streptavidina-perossidasi **Conjugate | 2** nei campioni, quindi incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.8. Lavaggio

Lavare come descritto al Punto 9.6.

9.9. Terza incubazione

Iniettare nei pozzetti 100 µl di substrato **Substrate**. Quindi incubare la piastra per 15 minuti al buio a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Successivamente inserire in tutti i pozzetti 50 µl di reagente di bloccaggio **Stop** per arrestare la reazione. Dopo aver accuratamente miscelato picchiettando leggermente sul lato della piastra, misurare l'estinzione a 450 nm (opzionale: 450/620 nm). Regolare il punto zero contro aria, ovvero senza la piastra per microtitolazione.

Nota:

I campioni di pazienti altamente positivi possono causare precipitati nerastri del substrato.

9.10. Protocollo di test abbreviato

I tempi di incubazione descritti ai punti 9.5, 9.7 e 9.9 possono essere notevolmente ridotti incubando la piastra a 37 °C e con una frequenza di agitazione pari a 20–25 Hz. (DSX®, ditta Dynex). Il tempo tempo di incubazione si modifica come segue:

1° Incubazione 1: 30 min

2° Incubazione 2: 15 min

3° Incubazione 3: 15 min

Possono essere utilizzati anche agitatori separati per piastre di microtitolazione come Thermo-mixer di Eppendorf (impostazione della frequenza: 850 giri al minuto) o DTS-2 di LTF Labor-technik (impostazione della frequenza 800 giri al minuto).

10. Controllo della qualità – indicazioni della scadenza dei reagenti

Per il controllo della qualità eseguire il controllo positivo e negativo ad ogni esecuzione del test al fine di garantire la stabilità dei reagenti e la corretta esecuzione del test. Il test è eseguito correttamente se il tasso di estinzione (O.D.) del controllo negativo è inferiore a 0,2 a 450 nm (inferiore a 0,160 a 450/620 nm) e il valore misurazione del controllo positivo è superiore a 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valore superiore a 0,2 (0,160) per il controllo negativo può indicare un lavaggio insufficiente. La deviazione dai valori richiesti, proprio come un'opacizzazione o una colorazione blu del substrato incolore prima dell'inserimento nei pozzetti, può indicare che i reagenti sono scaduti.

Se i valori stipulati non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata (p.es. calibrazione)
- Procedura di esecuzione del test corretta
- Controllare visivamente che i componenti del kit non presentino contaminazione o perdite: non utilizzare una soluzione di substrato che sia diventata blu.

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo la ripetizione del test, rivolgersi al produttore o al proprio distributore R-Biopharm locale.

11. Valutazione e interpretazione

11.1. Calcolo del valore limite

Per stabilire il valore limite, introdurre 0,15 unità di estinzione all'estinzione misurata per il controllo negativo.

$$\text{Valore limite} = \text{estinzione per il controllo negativo} + 0,15$$

11.2. Risultati del test

Il campione è considerato **positivo** se il tasso di estinzione supera il valore limite calcolato di più del 10 %.

Il campione viene considerato **marginale** se il tasso di estinzione è compreso tra 10 % in meno e 10 % in più rispetto al valore limite. Se l'esame ripetuto con un campione di feci fresco rientra ancora nella zona grigia, il campione viene considerato negativo. I campioni con estinzioni superiori al 10 % al di sotto del limite calcolato devono essere considerati **negativi**.

12. Limiti del metodo

Il test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B rileva la presenza di tossina A e B del *Clostridium difficile* in campioni di feci. Non è possibile stabilire una relazione tra il livello di estinzione rilevato e l'insorgenza o la gravità della sintomatologia clinica. **I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati nel contesto del quadro clinico.**

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

Un risultato **negativo** non esclude la possibilità di infezione da *Clostridium difficile*.

Il risultato può essere prodotto dalla decomposizione proteolitica delle tossine nel campione in seguito a condizioni di conservazione insoddisfacenti. Qualora a livello anamnestico sussista il sospetto di infezione da *Clostridium difficile*, l'esame deve essere ripetuto con un altro campione di feci.

Un risultato **marginale** può essere dovuto a distribuzione non omogenea delle tossine nel campione di feci. In questo caso, l'esame deve essere ripetuto con una seconda sospensione dallo stesso campione o in alternativa dovrà essere richiesto un altro campione di feci.

Risultati negativi per le tossine in una coltura di *Clostridium difficile* ottenuta da un campione di feci possono indicare la presenza di ceppi non tossigenici di *Clostridium difficile*. Per chiarire un simile risultato, la possibile produzione di tossine nelle colonie sospette deve essere esaminata tramite ELISA.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1. Qualità del test

In uno studio prospettico condotto presso un'importante clinica in Germania, sono stati esaminati 502 pazienti con sospetta CDAD (diarrea associata a *Clostridium difficile*) mediante test RIDASCREEN® ELISA e altri test ELISA presenti in commercio e gli stessi sono stati confrontati con il test di citotossicità come standard di riferimento. Il test RIDASCREEN® ELISA ha evidenziato una migliore corrispondenza con lo standard di riferimento. I risultati di questo studio sono riepilogati nella Tabella 1.

Tabella 1: Confronto tra RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B lo standard di riferimento (test di citotossicità con neutralizzazione)

		RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B	
		pos	neg
Standard di riferimento	pos	61	7
	neg	14	420

Sensibilità:	89,7 %	Valore predittivo positivo:	81,3 %
Specificità:	96,8 %	Valore predittivo negativo:	98,4 %

13.2. Reattività incrociata

Diversi microrganismi patogeni del tratto intestinale sono stati esaminati con il test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ELISA e non hanno evidenziato reattività incrociata. Questi test sono stati condotti con sospensioni batteriche (da 10⁶ a 10⁹ cfu/ml), con colture parassitarie (da 10⁷ a 10⁹ organismi/ml) e con supernatanti colturali di cellule infettate da virus. I risultati di questo studio sono riepilogati nella Tabella 2.

Tabella 2: Reazioni incrociate con microrganismi patogeni del tratto intestinale

Organismo	Risultato [OD 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

13.2.1. Specificità dei ceppi:

I seguenti ceppi di Clostridium sono risultati negativi al test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ELISA: *C. bifermentans*, *C. butyricum*, non tossigenico *C. difficile* (3 ceppi), *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. sporogenes*, *C. tetani*.

13.3. Precisione

La riproducibilità del test RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ELISA è stata verificata con sei riferimenti che rappresentano l'intero range di misurazione da negativo ad altamente positivo. Per la determinazione della riproducibilità intra-analisi, sono stati esaminati 40 repliche di questi riferimenti. Sono stati determinati i valori medi e i coefficienti di variazione (CV) per tre lotti dei kit. Per la riproducibilità inter-analisi, le misurazioni dei riferimenti sono state eseguite in 10 giorni lavorativi consecutivi con 2 serie al giorno con test doppi. Le misurazioni sono state eseguite con tre lotti di kit da parte di tre tecnici. La riproducibilità inter-lotto è stata determinata per tutti e tre i lotti di kit.

Riferimento Valore medio / CV	Intra-analisi			Inter-analisi			Inter-lotto
	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti 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. Sensibilità analitica

I limiti di rilevazione analitici delle tossine A e B di *Clostridium difficile* sono stati determinati separatamente. Il limite di bianco (LoB) è stato determinato mediante 270 analisi di campioni negativi mentre per le tossine A e B i limiti di rilevazione (LoD) sono stati analizzati in 90 test ciascuno. I risultati di questo studio sono riepilogati nella Tabella 1.

Tabella 1: LoB e LoD

	OD (450 nm)	Concentrazione analitica nel campione (ng/ml)	Concentrazione analitica nella sospensione del campione (1+10 in diluente) (ng/ml)
LoB	0,073	-	-
LoD (tossina A)	0,132	1,56	0,156
LoD (tossina B)	0,117	1,56	0,156

14. Sostanze interferenti

Le sostanze di seguito elencate non hanno evidenziato alcun effetto sui risultati del test se miscelate ai campioni di feci positivi e negativi alle tossine A e B di *C. difficile* alle concentrazioni descritte: solfato di bario (5 % w/w), loperamide (antidiarroico; 5 % w/w), Peptobismol (antidiarroico, 5 % v/w), mucine (5 % w/w), ciclamato di sodio (edulcorante artificiale, 5 % v/w), sangue umano (5 % v/w), acido stearico / acido palmitico (miscela 1:1, 40 % w/w), metronidazolo (0,5) (antibiotico 5 % v/w), diclofenac (0,00263 % v/w).

Appendice

Simboli specifici del test:

Plate	Piastra per microtitolazione:
Diluent 1	Tampone di diluizione del campione
Wash	Tampone di lavaggio
Control +	Controllo positivo
Control -	Controllo negativo
Conjugate 1	Coniugato 1
Conjugate 2	Coniugato 2
Substrate	Substrato
Stop	Reagente di bloccaggio

Letteratura

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.