

RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxina A/B

No do artigo: C0801



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



1. Uso previsto

Para uso no diagnóstico *in vitro*. RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B é um análise imunológica enzimática para a determinação qualitativa das toxinas A e B do *Clostridium difficile* em amostras de fezes humanas e em culturas de cepas de *Clostridium difficile* produtoras de toxinas cultivadas previamente a partir de amostras de fezes.

2. Resumo e explicação do teste

Diarreias são um efeito colateral relativamente frequente de terapias com antibióticos. Particularmente, desde a introdução da clindamicina no início da década de 1970, a ocorrência de formas mais graves de colite associada a antibióticos (AAC) tornou-se mais frequente, com sinais e sintomas que podem levar a uma colite pseudomembranosa (PMC) muito grave. Detectou-se que o patógeno *Clostridium difficile* causa colite pseudomembranosa (PMC) e é uma das causas de AAC e AAD. A produção das toxinas A e B por cepas toxígenas de *Clostridium difficile* desempenha um papel importante na etiologia das manifestações clínicas da doença. Há diferenças nas funções e na imunologia dessas proteínas com massas molares superiores a 200 kDA. A toxina A é uma enterotoxina e a toxina B é uma citotoxina; ambas as toxinas apresentam sinergia em seus efeitos *in vivo*. Considerando que algumas cepas do *Clostridium difficile* não produzem as toxinas e que aproximadamente 2–8% dos adultos saudáveis e até 50% das crianças com menos de dois anos de idade podem ser portadores do *Clostridium difficile*, a determinação dessas toxinas parece ser mais importante na prática diagnóstica do que a determinação do micro-organismo patogênico.

O ELISA RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ® é uma análise imunológica enzimática que pode determinar especificamente as toxinas A e B simultaneamente em amostras de fezes dos pacientes, com a ajuda de anticorpos monoclonais. Resultados confiáveis do exame já são disponibilizados dentro de duas horas, possibilitando o início de medidas terapêuticas eficientes em um estágio inicial.

3. Princípio do teste

O teste RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B emprega anticorpos monoclonais em um método do tipo sanduíche. Esses anticorpos monoclonais relacionados às toxinas A e B do *Clostridium difficile* estão ligados à superfície do poço da placa de micropoços.

Usa-se uma pipeta para posicionar uma suspensão da amostra de fezes para ser examinada, bem como as amostras de controle no poço da placa de micropoços, juntamente com anticorpos antitoxinas A/B (conjugado 1) para incubação à temperatura ambiente (20 – 25 °C). Depois de uma etapa de lavagem, o conjugado de estreptavidina poli-peroxidase (Conjugado 2) é adicionado e incubado novamente à temperatura ambiente (20 – 25 °C). Se há toxinas em uma amostra, os anticorpos imobilizados, as toxinas e os anticorpos conjugados formam um

complexo de sanduíche. Outra etapa de lavagem remove o conjugado de estreptavidina poli-peroxidase não ligado.

Em amostras positivas, a adição de um substrato muda a enzima ligada, de uma solução incolor para uma solução azul nos poços da placa de micropoços. A adição de um reagente de parada muda a cor de azul para amarelo. A extinção é proporcional à concentração das toxinas A e B encontradas na amostra.

4. Reagentes fornecidos

Os reagentes do kit são suficientes para 96 determinações.

Plate	96	Placa de micropoços, 12 tiras de micropoços (que podem ser divididas) no suporte para tiras; revestida com anticorpos monoclonais específicos para as toxinas A e B do <i>Clostridium difficile</i>
Diluent 1	100 ml	Tampão de diluição de amostra, solução de NaCl tamponada com proteína; pronto para usar; cor azul
Wash	100 ml	Tampão de lavagem, solução de NaCl tamponada com fosfato (concentrada 10 vezes); contém 0,1% de timerosal
Control +	2 ml	Controle positivo; toxina inativada; pronto para usar
Control -	2 ml	Controle negativo (tampão de diluição da amostra); pronto para usar
Conjugate 1	13 ml	Anticorpos conjugados à biotina contra as toxinas A e B do <i>Clostridium difficile</i> em uma solução de proteína estabilizada; pronto para usar; cor azul
Conjugate 2	13 ml	Conjugado de estreptavidina poli-peroxidase em solução de proteína estabilizada; pronto para usar; cor laranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrogênio/TMB; pronto para usar
Stop	12 ml	Reagente de parada; 1 N de ácido sulfúrico; pronto para usar

5. Reagentes e sua armazenagem

Todos os reagentes devem ser armazenados a 2 – 8 °C e podem ser usados até a data impressa na etiqueta. Armazenado a 2 – 8 °C, o tampão de lavagem diluído pode ser usado por, no máximo, 4 semanas. Deve-se evitar a contaminação microbiana.

Após a data de expiração, a garantia da qualidade já não é válida. A bolsa de alumínio deve ser aberta com tesoura de forma que a vedação de grampo não seja rasgada. As tiras de

micropoços que não forem necessárias devem ser colocadas em uma bolsa de alumínio imediatamente e armazenadas a 2 – 8 °C.

O substrato incolor também deve ser protegido contra a luz solar direta, para impedir que se decomponha ou fique azul devido à auto-oxidação. Depois que o substrato fica azul, ele não pode mais ser utilizado.

6. Reagentes adicionais necessários – e equipamento necessário

6.1. Reagentes fornecidos

- Água destilada ou deionizada

6.2. Equipamento

- Tubos de ensaio
- Pipetas descartáveis (Artigo no Z0001)
- Misturador de vórtice (opcional, consulte 9.3.)
- Micropipeta para volumes de 50 – 100 µl e 1 ml
- Cilindro de medição (1.000 ml)
- Cronômetro
- Dispositivo de lavagem para placas de micropoços ou pipetas multicanal (300 µl)
- Fotômetro para placas de micropoços (450 nm e filtro de referência de 620–650 nm)
- Papel filtro (toalhas para laboratório)
- Contêiner de resíduos com uma solução de 0,5% de hipoclorito

7. Precaução para os usuários

Somente para uso no diagnóstico *in vitro*.

Este ensaio só deve ser realizado por profissionais de laboratório treinados. As diretrizes para trabalhar em laboratórios médicos devem ser seguidas. Sempre siga rigorosamente as instruções para os usuários referentes a este teste.

As amostras ou reagentes não devem ser pipetados com a boca, e o contato com a pele ferida ou com membranas mucosas deve ser evitado. Use equipamento de proteção pessoal (luvas adequadas, avental, óculos de segurança) ao manusear as amostras e lave as mãos depois de concluir o teste. Não fume, coma ou beba nas áreas onde amostras ou reagentes estão sendo processados.

Para ver mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com.

O controle positivo incluído no kit contém a toxina do *Clostridium difficile* inativa que apresentou uma reação positiva antes da inativação no teste de citotoxicidade. As toxinas e as

amostras de fezes devem ser tratadas como material potencialmente infeccioso e manuseadas de acordo com os regulamentos nacionais de segurança.

O tampão de lavagem contém 0,1% de timerosal como conservante. Não se deve permitir que essa substância entre em contato com a pele ou membranas mucosas.

Garanta o descarte adequado e responsável de todos os reagentes e materiais após o uso. Para o descarte, siga os regulamentos nacionais.

8. Coleta e armazenagem de amostras

As amostras de fezes devem ser tomadas assim que possível, **mas** dentro de três dias após a ocorrência dos sintomas iniciais de diarreia.

Até o momento da utilização, armazene o material de teste a 2–8 °C. Se não for possível usar o material para um teste dentro de três dias, recomendamos a armazenagem a –20 °C ou menos. Evite congelar e descongelar a amostra repetidamente. Depois de diluir uma amostra de fezes no tampão de diluição de amostra 1:11, ela pode ser armazenada a 4 °C para uso dentro de três dias.

As amostras de fezes não devem ser coletadas em contêineres de transporte que contenham meios conservantes, soros animais, íons metálicos, agentes oxidantes ou detergentes, já que podem interferir no teste da toxina A/B do *Clostridium difficile* RIDASCREEN®.

Se esfregaços retais forem utilizados, certifique-se de que o volume de material fecal seja suficiente (aprox. 100 mg) para o teste.

O rastreio do contato deve incluir amostras de fezes tomadas de pessoas de contato que não apresentam sintomas clínicos, para identificar portadores assintomáticos.

9. Procedimentos do teste

9.1. Informações gerais

Todos os reagentes e o micropoço **Plate** devem atingir a temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes do uso. As tiras de micropoços não devem ser removidas da bolsa de alumínio até atingir a temperatura ambiente. Os reagentes devem ser misturados totalmente imediatamente antes do uso. Depois do uso, as tiras de micropoços (colocadas em bolsas vedadas) e os reagentes devem ser armazenados a 2 – 8 °C. Depois de usadas, as tiras de micropoços não podem ser usadas novamente. Os reagentes e as tiras de micropoços não devem ser usados se a embalagem estiver danificada ou os frascos estiverem vazando.

Para evitar a contaminação cruzada, deve-se impedir que as amostras entrem em contato com os componentes do kit. O teste não deve ser realizado sob luz solar direta. Recomendamos a cobertura da tira de micropoços ou a vedação com plástico para evitar perdas por evaporação.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

Misture 1 parte de concentrado de tampão de lavagem **Wash** com 9 partes de água destilada. Os cristais presentes no concentrado devem ser aquecidos de antemão (em banho-maria a 37 °C) para serem dissolvidos.

9.3. Preparação das amostras

Pegue um tubo de ensaio etiquetado e coloque 1 ml de tampão de diluição de amostra RIDASCREEN® **Diluent|1** nele. Use uma pipeta descartável (artigo no Z0001) para sugar uma amostra fina de fezes (aprox. 100 µl) até um ponto logo acima da segunda marcação e adicione ao tampão no tubo de ensaio para fazer uma suspensão. Para fazer uma suspensão com uma amostra de fezes sólidas, adicione uma quantidade equivalente (aprox. 50–100 mg) com uma espátula ou ansa de inoculação descartável.

Homogeneíze a suspensão de fezes por sucção e ejeção com uma pipeta ou, como alternativa, misture com um misturador Vortex. Deixe a suspensão descansar por um breve período (10 minutos) para que as partículas grossas de fezes assentem, e esse sobrenadante clarificado da suspensão de fezes pode ser usado diretamente no teste. Caso o procedimento do teste seja realizado em um sistema ELISA automatizado, o sobrenadante deve **obrigatoriamente** estar livre de partículas. Nesse caso, é recomendável centrifugar a amostra a 2.500 G durante 5 minutos.

Observação:

As amostras de fezes diluídas em **Diluent|1** podem ser testadas em todos os ELISA RIDASCREEN® nos quais **Diluent|1** é usado.

9.4. Teste das toxinas a partir de culturas do *Clostridium difficile*

Para examinar as colônias após a cultura em substratos sólidos (CCFA ou ágar de Schaedler) use uma ansa de inoculação para removê-las da placa de ágar; suspenda em 1 ml do tampão de diluição da amostra **Diluent|1** e misture bem. Neste caso, é recomendável centrifugar a suspensão (2.500 G durante 5 minutos). O sobrenadante clarificado pode ser usado diretamente no teste.

Para examinar culturas líquidas, suspenda 100 µl da amostra em 1 ml do tampão de diluição da amostra **Diluent|1** e misture bem. Neste caso, é recomendável centrifugar a suspensão (2.500 G durante 5 minutos). O sobrenadante clarificado pode ser usado diretamente no teste.

Observação:

Só é possível determinar toxinas em uma cultura de células de *Clostridium* após o início da esporulação. A esporulação e a excreção associada de toxinas ocorre somente na fase tardia e estacionária do crescimento do patógeno, quando todos os nutrientes foram consumidos.

9.5. Primeira incubação

Depois de encher um número suficiente de poços no suporte de tiras, adicione 100 µl do positivo **Control | +**, do negativo **Control | -** ou da suspensão da amostra de fezes (ou, caso esteja disponível, o sobrenadante da suspensão da colônia) aos poços. Em seguida, adicione 100 µl do anticorpo conjugado à biotina **Conjugate | 1** e misture (batendo levemente no lado da placa); depois, incube por 60 minutos à temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.6. Lavagem

Lavar cuidadosamente é importante para a obtenção de resultados corretos. Portanto, siga rigorosamente as instruções. A substância incubada nos poços deve ser esvaziada em um contêiner de resíduos para o descarte de acordo com os regulamentos locais. Em seguida, gire a placa em direção ao papel absorvente e bata para remover a umidade residual. Em seguida, lave a placa cinco vezes usando 300 µl de tampão de lavagem em cada vez. Certifique-se de que os poços sejam totalmente esvaziados, deitando-os, após cada lavagem, em uma parte do papel absorvente que ainda esteja seca e não tenha sido usada.

Se você usa uma lavadora de microplacas ou um ELISA totalmente automatizado, certifique-se de que a máquina esteja ajustada corretamente; se necessário, solicite os ajustes do fabricante. Os aparelhos fornecidos pela R-Biopharm já estão programados com ajustes e protocolos de controle validados. Para evitar o entupimento das agulhas de lavagem, entregue somente suspensões de fezes livres de partícula (consulte o Item 9.3., Preparação das amostras). Além disso, certifique-se de que todo o líquido seja aspirado durante cada etapa de lavagem.

9.7. Segunda incubação

Use uma pipeta para colocar 100 µl de conjugado de estreptavidina poli-peroxidase **Conjugate | 2** nos poços e, em seguida, incube durante 30 minutos à temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.8. Lavagem

Lave conforme o descrito no Item 9.6.

9.9. Terceira incubação

Encha todos os poços com 100 µl de substrato **Substrate**. Incube a placa por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente (20 – 25 °C). Em seguida, coloque 50 µl de reagente de parada em todos os poços **Stop** a fim de parar a reação. Depois de misturar cuidadosamente ao bater levemente no lado da placa, meça a extinção a 450 nm (opcional: 450/620 nm). Ajuste o ponto zero no ar, ou seja, sem a placa de micropoços.

Observação:

Amostras altamente positivas de pacientes podem provocar precipitados de cor preta do substrato.

9.9 Protocolo de teste resumido

Os tempos de incubação descritos nos itens 9.5, 9.7 e 9.9 podem ser significativamente reduzidos caso a placa seja incubada a 37 °C e com uma frequência de vibração de 20 – 25 Hz. (DSX®, Fa. Dynex). Os tempos de incubação passam a ser os seguintes:

1. Incubação 1: 30 minutos
2. Incubação 2: 15 minutos
3. Incubação 3: 15 minutos

Agitadores de placas de micropoços separados também são adequados, como o Thermomixer da Eppendorf (ajuste de frequência: 850 RPM) ou o DTS-2 da LTF Labortechnik (ajuste de frequência: 800 RPM).

10. Controle de qualidade – indicações da expiração do reagente

Para fins de controle de qualidade, controles positivos e negativos devem ser usados cada vez que o teste é realizado, para garantir que os reagentes estejam estáveis e que o teste seja realizado corretamente. O teste foi realizado corretamente se a taxa de extinção (O. D.) do controle negativo é inferior a 0,2 a 450 nm (inferior a 0,160 a 450/620 nm) e o valor medido para o controle positivo é maior que 0,8 a 450 nm ou a 450/620 nm. Um valor superior a 0,2 (0,160) para o controle negativo pode indicar que a lavagem foi insuficiente. O desvio dos valores exigidos, bem como a cor turva ou azul do substrato incolor antes de ter sido colocado nos poços, pode indicar que os reagentes expiraram.

Se os valores estipulados não forem obtidos, verifique os pontos a seguir antes de repetir o teste:

- Data de expiração dos reagentes usados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo usado (por exemplo: calibragem)
- Procedimento de teste correto
- Inspeção visual dos componentes do kit à procura de contaminação ou vazamentos – a solução de substrato que se tornou azul não deve ser usada.

Se mesmo assim as condições não forem preenchidas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor local da R-Biopharm.

11. Avaliação e interpretação

11.1. Cálculo do corte

Para estabelecer o corte, 0,15 unidade de extinção é adicionada à extinção medida para o controle negativo.

$$\text{Corte} = \text{extinção para o controle negativo} + 0,15$$

11.2. Resultados do teste

A avaliação da amostra é **positiva** se a taxa de extinção é mais do que 10% superior ao valor de corte calculado.

A avaliação da amostra é **marginal** se a taxa de extinção varia entre 10% menor e 10% maior que o valor de corte. Se a repetição do exame com uma nova amostra de fezes fica novamente na zona cinza, a avaliação da amostra é negativa.

Amostras com extinções mais de 10% abaixo do corte calculado devem ser consideradas **negativas**.

12. Limitações do método

O teste da toxina A/B do *Clostridium difficile* RIDASCREEN® mostra a presença das toxinas A e B de *Clostridium difficile* em amostras de fezes. Não é possível associar o nível determinado de extinção à ocorrência ou gravidade dos sintomas clínicos. **Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em conjunto com o quadro clínico.**

Um resultado **positivo** não descarta a presença de outros patógenos infecciosos.

Um resultado **negativo** não descarta a possibilidade de infecção por *Clostridium difficile*.

O resultado pode ser causado pela quebra proteolítica de toxinas na amostra devido à condições insatisfatórias de armazenagem. Se a anamnese do paciente respalda a suspeita de infecção por *Clostridium difficile*, deve-se repetir o exame com outra amostra de fezes.

Um resultado **marginal** pode ser causado pela distribuição não homogênea de toxinas na amostra de fezes. Nesse caso, o exame deve ser repetido com uma segunda suspensão da mesma amostra ou outra amostra de fezes deve ser solicitada.

Resultados de teste negativos referentes a toxinas em uma cultura de *Clostridium difficile* a partir de uma amostra de fezes pode indicar a presença de cepas não toxígenas de *Clostridium difficile*. Para esclarecer um resultado desse tipo, a possível produção de toxinas em colônias suspeitas deve ser examinada por meio do ELISA.

13. Características de desempenho

13.1. Qualidade do teste

Em um estudo prospectivo realizado em uma clínica de grande porte na Alemanha, 502 amostras de fezes de pacientes com suspeita de CDAD (diarreia associada ao *Clostridium difficile*) foram examinadas pelo ELISA RIDASCREEN® e outros ELISAs comerciais e posteriormente comparadas com o teste de citotoxicidade como padrão ouro. Foi comprovado que o ELISA RIDASCREEN® ELISA coincide melhor com o padrão ouro. Os resultados desse estudo são resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Comparação do teste RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B com o padrão ouro (teste de citotoxicidade com neutralização)

		RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B	
		pos.	neg.
Padrão ouro	pos.	61	7
	neg.	14	420

Sensibilidade:	89,7%
Especificidade:	96,8%
Previsibilidade positiva:	81,3%
Previsibilidade negativa:	98,4%

13.2. Reatividade cruzada

Diversos micro-organismos patogênicos do trato intestinal foram examinados com o ELISA RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B e não apresentaram reatividade cruzada. Esses testes foram realizados com suspensões bacterianas (10^6 a 10^9 cfu/ml), com culturas de parasitas (10^7 a 10^9 organismos/ml) e sobrenadantes de culturas de células infectadas com o vírus. Os resultados desse estudo são resumidos na Tabela 2.

Tabela 2: Reatividade cruzada com micro-organismos patogênicos do trato intestinal

Organismo	Resultado [OD 450]
Adenovírus	0,060
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,057
Astrovírus	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> (ETEC)	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
Rotavírus	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. Especificidade da cepa:

As seguintes cepas de *Clostridium* deram resultado negativo no ELISA da Toxina A/B do *Clostridium difficile* RIDASCREEN®: *C. bifermentans*, *C. butyricum*, non-toxigenic *C. difficile* (3 cepas), *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. sporogenes*, *C. tetani*.

13.3. Precisão

A reprodutibilidade do ELISA RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B® foi testada com seis referências que representam a gama de medição completa, do negativo ao altamente positivo. Para determinar a reprodutibilidade intraensaio, 40 réplicas dessas referências foram testadas. Os valores médios e os coeficientes de variação (VC) de três lotes dos kits foram determinados. Para a reprodutibilidade intraensaio, foram testadas referências de dez dias úteis seguidos em duplicadas, com duas execuções por dia. As medições foram determinadas por três técnicos e se referem a três lotes de kits. A reprodutibilidade entre os lotes foi determinada para todos os três lotes dos kits.

Referência Valor médio/VC	Intraensaio			Entre ensaios			Entre lotes
	Lote de kits 1	Lote de kits 2	Lote de kits 3	Lote de kits 1	Lote de kits 2	Lote de kits 3	Lote de kits 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 Sensibilidade analítica

Os limites de detecção analítica das toxinas A e B do *Clostridium difficile* foram determinados separadamente. O limite do branco (LoB) foi determinado com 270 ensaios de amostras negativas; para as toxinas A e B, os limites de detecção (LoD) foram analisados em 90 ensaios cada um. Os resultados desse estudo são resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: LoB e LoD

	OD (450 nm)	Concentração analítica na amostra (ng/ml)	Concentração analítica na suspensão da amostra (1+10 em diluente) (ng/ml)
LoB	0,073	-	-
LoD (toxina A)	0,132	1,56	0,156
LoD (toxina B)	0,117	1,56	0,156

14. Substâncias interferentes

As substâncias da lista a seguir não apresentaram efeitos sobre os resultados do teste quando misturadas com as amostras de fezes positivas para a toxina A/B de *C. difficile* e amostras de fezes negativas para a toxina A/B de *C. difficile* nas concentrações descritas: sulfato de bário (5% w/w), loperamida (medicamento antidiarreico; 5% w/w), Pepto-Bismol (medicamento antidiarreico, 5% v/w), mucinas (5% peso por peso), ciclamato de sódio (adoçante artificial, 5% v/w), sangue humano (5% v/w), ácido esteárico/ácido palmítico (misture 1:1, 40% w/w), metronidazol (0,5) (antibiótico 5% v/w), diclofenaco (0,00263% v/w).

Apêndice

Símbolos específicos do teste:

Plate	Placa de micropoços
Diluent 1	Tampão de diluição da amostra
Wash	Tampão de lavagem
Control +	Controle positivo
Control -	Controle negativo
Conjugate 1	Conjugado 1
Conjugate 2	Conjugado 2
Substrate	Substrato
Stop	Reagente de parada

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: 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.