

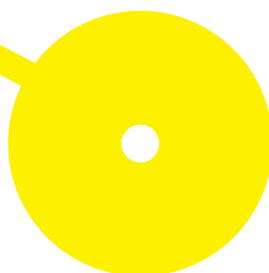
M

MESTRADO  
ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

# Comparação dos imunoensaios BioMaxima e mariPOC de *Clostridium difficile* recorrendo a amostras fecais de utentes do Hospital de Braga

Maria Inês Da Silva Barros

10/2022





**Hospital  
de Braga EPE**

**Comparação dos imunoensaios BioMaxima e mariPOC de *Clostridium difficile* recorrendo a amostras fecais de utentes do Hospital de Braga**

**Autor**

Maria Inês Da Silva Barros

**Orientadores**

Prof. Doutora | Sandra Marlene Mota | Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS | P. Porto)

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Análises Clínicas e Saúde Pública** –Área de Especialização em **Microbiologia e Saúde Pública** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

A realização deste estágio e de todo o mestrado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não teria sido possível terminar esta etapa académica tão importante e por isso sou imensamente grata.

À Professora Doutora Sandra Marlene Mota, pela sua orientação, total apoio e disponibilidade, pelas opiniões e críticas, por toda a disponibilidade e paciência ao longo destes meses.

Ao Dr. Fernando Mamede Branca que me acolheu no laboratório de Biologia Molecular, sendo meu orientador e contribuindo sempre para o meu desenvolvimento enquanto profissional em termos teóricos e práticos.

À Dr. Maria e às técnicas que me acompanharam sempre, que fizeram por me ensinar um pouco do que sabem, e contribuíram para o meu bem-estar no decorrer do estágio.

À equipa técnica do laboratório veterinário INNO que não falharam com o companheirismo e apoiaram sempre em termos morais e facilitaram a possibilidade de realizar o estágio com adaptações a nível laboral.

Por fim, sabendo que nada disto seria possível sozinha, dirijo um agradecimento especial aos meus pais e irmãos por acreditarem, incentivarem e apoiarem incondicionalmente durante todo o caminho. Ao meu namorado Ricardo por toda a paciência e palavras de motivação, por nunca falhar com a boa disposição e por aguentar os altos e baixos deste percurso académico sempre ao meu lado. Não seria tão gratificante terminar esta etapa da minha vida se não pudesse celebrá-la contigo, um muito obrigado de coração.

## **Resumo**

*Clostridium difficile* é uma bactéria que afeta a flora intestinal provocando infecção e possível colite pseudomembranosa. Esta infecção têm um grande impacto a nível hospitalar, por envolver a formação de esporos que dificulta a sua eliminação e facilita a disseminação que ocorre pela via fecal-oral.

O diagnóstico laboratorial permanece em constante debate, no entanto existem diferentes métodos de análise disponíveis. Durante o estágio foi realizado um estudo com o objetivo de comparar duas metodologias, o teste do mariPOC® e o teste da BioMaxima, com o teste implementado no laboratório, o C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® da TECHLAB, em conjunto com a PCR em tempo real do gene *tcdB* que nos permite confirmar estirpes toxigénicas de *C. difficile*.

Das duas metodologias em estudo, o mariPOC apresentou melhores resultados de sensibilidade 88%, especificidade 94% e valor preditivo positivo 94% na deteção de estirpes toxigénicas. Acresce ainda como vantagens desta metodologia a automatização e obtenção de resultados semiquantitativos, não disponíveis para o ensaio da BioMaxima. Face ao constante desenvolvimento de novas metodologias para diagnóstico, é fundamental que os laboratórios realizem estudos como este, antes da implementação de uma nova metodologia, de forma a que cada laboratório possa garantir a qualidade dos seus resultados.

**Palavras-chave:** *Clostridium difficile*, Diagnóstico, Imunoensaio de membrana, tecnologia TPX (Two-Photon Excitation)

## **Abstract**

*Clostridium difficile* is a bacterium that affects the intestinal flora causing infection and possible pseudomembranous colitis. This infection has a major impact on hospital environments, because it involves the formation of spores that makes it difficult to eliminate them and facilitates the spread that occurs through the fecal-oral system.

The laboratory diagnosis remains under constant debate, however there are different methods of analysis available. During the internship, a study was performed to compare two methodologies, the mariPOC® test and the BioMaxima test, with the implemented test in the laboratory, the C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® by TECHLAB, combined with real-time PCR of the *tcdB* gene that allows us to confirm the existence of toxigenic strains of *C. difficile*.

The two methodologies under study, mariPOC demonstrate better results in terms of sensitivity 88%, specificity 94% and positive predictive value 94% on the detection of toxigenic strains. As advantages in this methodology it can be automated and obtain semi-quantitative results, that is not possible on BioMaxima. Regarding the constant development of new methodologies for diagnosis, it is essential that laboratories conduct studies like this one, before implementing a new methodology, as a quality measure to improve the assurance of their results.

**Keywords:** *Clostridium difficile*, Diagnosis, Membrane Immunoassay, TPX (Two-Photon Excitation) technology

## **Siglas e abreviaturas**

A	Adenina
C	Citosina
Ct	Limiar da fase exponencial; do inglês <i>cycle threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico; do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados; do inglês <i>deoxynucleoside triphosphates</i>
E	Especificidade
EIA	Imunoensaio enzimático; do inglês <i>enzyme immunoassay</i>
EPE	Entidade pública empresarial
FRET	Transferência de energia de fluorescência; do inglês <i>fluorescence resonance energy transfer</i>
G	Guanina
GDH	Glutamato desidrogenase; do inglês <i>glutamate dehydrogenase</i>
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1; do inglês <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
ICD	Infeção por <i>Clostridium difficile</i>
IL-8	Interleucina 8
LCR	Líquido cefalorraquidiano
PCR	Reacção em cadeia da polimerase; do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico; do inglês <i>ribonucleic acid</i>
S	Sensibilidade
T	Timina
TC	Cultura toxigênica; do inglês <i>toxigenic culture</i>
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
TPX	Excitação de dois fótons; do inglês <i>two-photon excitation</i>
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
VP	Verdadeiro positivo
VN	Verdadeiro negativo
FP	Falso positivo
FN	Falso negativo

## Índice

<b>1.</b>	<b>Instituição e contextualização do estágio</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Caracterização do laboratório</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Objetivos do estágio</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Diagnóstico molecular em ambiente hospitalar</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1.</b>	<b>Extração e purificação de DNA e RNA</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1.1.</b>	<b>MagNA Pure 24</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1.2.</b>	<b>KingFisher Flex</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2.</b>	<b>Amplificação de Ácidos Nucleicos</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2.1.</b>	<b>PCR em tempo real</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2.2.</b>	<b>Nested PCR</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2.3.</b>	<b>Multiplex PCR</b> .....	<b>12</b>
<b>3.</b>	<b>Comparação dos imunoenaios BioMaxima e mariPOC de <i>Clostridium difficile</i></b> .....	<b>13</b>
<b>3.1.</b>	<b><i>Clostridium difficile</i></b> .....	<b>13</b>
<b>3.2.</b>	<b>Diagnóstico Laboratorial</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>TECHLAB – C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2.2.</b>	<b>mariPOC® – Gastro and CDI</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2.3.</b>	<b>BioMaxima – <i>Clostridium difficile</i> GDH A+B</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2.4.</b>	<b>PCR em tempo real de <i>tcdB</i></b> .....	<b>17</b>
<b>3.3.</b>	<b>Objetivo</b> .....	<b>17</b>
<b>4.</b>	<b>Metodologia</b> .....	<b>18</b>
<b>5.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>21</b>
<b>6.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>23</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>25</b>
<b>8.</b>	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>26</b>

## **Índice de Tabelas**

**Tabela 1:** Resultados dos imunoensaios realizados para a detecção de GDH e toxinas A/B em função do teste TECHLAB .....21

**Tabela 2:** Resultados dos imunoensaios para a toxina B em função da análise PCR em tempo real .....22



## **Índice de Figuras**

<b>Figura 1:</b> Esquema de etapas da purificação de ácidos nucleicos no sistema MagNA Pure 24.....	<b>4</b>
<b>Figura 2:</b> Esquema da transferência de partículas magnéticas de um poço para outro. ....	<b>5</b>
<b>Figura 3:</b> Esquema do comportamento da molécula alvo de DNA durante a PCR.....	<b>8</b>
<b>Figura 4:</b> Representação gráfica de uma curva de reação de PCR em tempo real e as suas fases. ....	<b>11</b>

## **1. Instituição e contextualização do estágio**

O estágio curricular e respetivo projeto são objeto de avaliação da unidade curricular de Estágio do Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública, ramo de Microbiologia e Saúde Pública. Este estágio foi realizado no Hospital de Braga, EPE, no laboratório de Biologia Molecular, do Serviço de Patologia Clínica e teve uma duração de 5 meses, tendo decorrido entre Outubro de 2021 e Fevereiro de 2022.

Este relatório tem como propósito expor os conhecimentos adquiridos assim como as atividades observadas e experienciadas ao longo do período de estágio, bem como realizar uma comparação entre metodologias para diagnóstico de *C. difficile*.

### **1.1. Caracterização do laboratório**

O laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Braga têm como objetivo o apoio ao diagnóstico e tratamento de utentes da instituição. Tem como função a deteção e identificação de agentes infecciosos bem como deteção de mutações genéticas associadas a doença permitindo obter um diagnóstico laboratorial que juntamente com o diagnóstico clínico orienta o médico para a terapêutica mais adequada ao utente.

As boas práticas de laboratório de biologia molecular passam pela separação das diferentes atividades por diferentes espaços físicos. Esta é uma medida essencial para evitar contaminações. (1)

O laboratório de Biologia Molecular no Hospital de Braga segue esta boa prática e por isso é constituído por 3 salas distintas que estão concebidas de forma a proporcionarem um processamento unidirecional das amostras. A primeira sala destina-se à receção e processamento das amostras biológicas e extração de ácidos nucleicos. Na sala seguinte são realizadas as Reações em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e análise pós-PCR. Na última sala é efetuada a análise genética quando necessária, por exemplo nos casos de deteção de HIV (vírus da imunodeficiência humana), a interpretação e validação de resultados e envio de resultados por sistema informático.

### **1.2. Objetivos do estágio**

O estágio no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Braga teve como objetivos consolidar conhecimentos e desenvolver competências na área do diagnóstico molecular, nomeadamente, selecionar a amostra e processá-la adequadamente para os diferentes ensaios realizados, conhecer o princípio das diferentes técnicas utilizadas na extração de ácidos nucleicos e amplificação dos mesmos,

integrar e realizar a rotina laboratorial; interpretar e avaliar os resultados obtidos de acordo com a metodologia utilizada.

## **2. Diagnóstico molecular em ambiente hospitalar**

A biologia molecular é uma ramo da biologia que têm como objetivo estudar interações entre sistemas celulares, ácidos nucleicos (DNA e RNA) e a síntese de proteínas. (2)

O diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas passa pelo isolamento e identificação do agente etiológico, que pode ser conseguido de diferentes formas. Em laboratório a rapidez e precisão dos resultados é fundamental para auxiliar a equipa médica no tratamento mais adequado e em tempo útil. Para doenças de rápida evolução um diagnóstico precoce melhora o prognóstico do paciente e permite um tratamento mais eficaz. (2)

O recurso a técnicas de diagnóstico molecular, nomeadamente a PCR, permitiu aumentar a rapidez, sensibilidade e especificidade face aos métodos tradicionais. Esta ferramenta molecular tornou-se assim valiosa no apoio ao diagnóstico clínico permitindo orientar o médico mais rapidamente para um tratamento específico. (2)

### **2.1. Extração e purificação de DNA e RNA**

A extração e purificação de ácidos nucleicos (DNA e RNA) são duas etapas fundamentais para a obtenção de um resultado de qualidade. (3)

A extração de DNA e RNA pode ser realizada a partir de diferentes amostras biológicas tais como sangue total, plasma, fezes, urina, líquido cefalorraquidiano (LCR), expectoração, entre outras. Diferentes amostras exigem metodologias adaptadas às suas características, algumas, por exemplo, necessitam ser diluídas ou digeridas antes de iniciar o processo de extração. O protocolo de extração é escolhido consoante a molécula de interesse (DNA ou RNA), o tipo de amostra, o grau de pureza e o rendimento necessário para o próximo passo de processamento. (3,4)

No passado, a extração de ácidos nucleicos era um processo moroso, maioritariamente manual com várias etapas de centrifugação, e originavam um produto final muitas vezes com graus de pureza e rendimento baixos. (3,4) A qualidade e integridade dos ácidos nucleicos isolados afeta diretamente os resultados de todos os testes sucessivos. (4) Atualmente a evolução tecnológica veio automatizar muitos dos processos, permitindo uma maior rapidez, possibilitando o trabalho em grande escala, melhor rendimento, reprodutibilidade e pureza. (4)

Existem diferentes métodos de isolamento de ácidos nucleicos, os primeiros procedimentos laboratoriais de rotina para isolamento de ácidos nucleicos foram desenvolvidos a partir de estratégias de centrifugação em gradiente de densidade. (4,5) Com o evoluir do tempo os procedimentos de extração foram sendo modificados para otimizar o rendimento de produtos específicos. Existe a possibilidade de isolar ácidos nucleicos através de métodos orgânicos, inorgânicos e de fase sólida. (5)

Os métodos orgânicos utilizam sais orgânicos com o objetivo de precipitar moléculas de interesse. Estes métodos consistem na lise da amostra recorrendo a um detergente ou substância caotrópica, juntamente com as proteinases, seguindo-se várias etapas utilizando solventes orgânicos como fenol e/ou clorofórmio, que são tóxicos e requerem um tratamento especial dos resíduos produzidos. (4)

Após a libertação dos ácidos nucleicos do interior da célula para o meio, é necessário fazer a remoção de lípidos, proteínas, carboidratos e outros possíveis contaminantes, recorrendo a uma mistura de solução salina, com pH baixo e a uma solução orgânica de clorofórmio e fenol. É assim possível dissolver substâncias hidrofóbicas como lipoproteínas. (5)

Os métodos inorgânicos também conhecidos por "*slating out*" surgiram pelo incentivo a desenvolver métodos alternativos para o uso de solventes orgânicos tóxicos. (5,6) Este método utiliza apenas o baixo pH e alta concentração salina para precipitar as proteínas e deixar o DNA em suspensão. O DNA em seguida é precipitado através do uso de isopropanol e posteriormente suspenso em tampão Tris-EDTA ou água. (5)

Os métodos em fase sólida são fáceis de encontrar no mercado e permitem uma extração e purificação mais rápida e eficiente. (4) São exemplos de métodos de extração o uso de matrizes de sílica, partículas de vidro, transportadores de troca aniônica e mecanismos de exclusão de tamanho. (3,4)

Os métodos magnéticos são os mais utilizados atualmente devido à separação simples e eficiente de ácidos nucleicos. (4,7) O uso de partículas magnéticas em processos de extração de ácidos nucleicos tem muitas vantagens em relação a outras técnicas de separação sem recurso a partículas magnéticas. Os fragmentos sendo magnéticos facilitam a remoção, por exemplo com um íman. Este método evita passos de centrifugação, que podem danificar a integridade dos ácidos nucleicos da amostra em análise. (3)

As separações magnéticas são processos bastante versáteis na área da biotecnologia, contudo podem também apresentar algumas desvantagens, por exemplo, a presença de material celular ou outros contaminantes, como proteínas ou carboidratos após a extração que podem interferir nas reações de PCR seguintes. (3) Assim como a possibilidade de contaminações cruzadas entre amostras. (8)

O isolamento de ácidos nucleicos compreende várias etapas, sendo as principais a lise celular e a purificação dos ácidos nucleicos. (3,7) A lise celular consiste na ruptura das células presentes que libertam os seus ácidos nucleicos para o meio. Após este processo os restos celulares e proteínas são removidos

obtendo-se o ácido nucleico purificado, o qual é eluído em volume adequado de água ultrapura ou solução tampão adequada. (9,10)

Na fase de lise celular, são bastantes os protocolos de extração de ácidos nucleicos que recomendam o uso de proteinase K para digerir proteínas. (11,12)

A proteinase K é uma enzima proteolítica de amplo espectro, inespecífica, bastante utilizada para inativar proteínas contaminantes em biologia molecular. (11,12)

No laboratório de biologia molecular do hospital de Braga utilizam-se 2 equipamentos para fazer a extração e purificação de ácidos nucleicos: o MagNA Pure 24 e o KingFisher Flex.

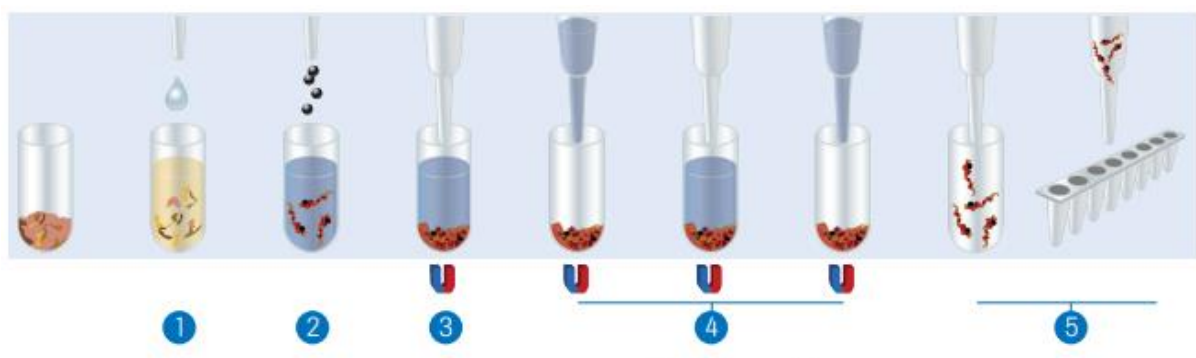
### 2.1.1. MagNA Pure 24

O MagNA Pure 24 permite a extração de ácidos nucleicos de uma forma automatizada . Utiliza um kit de reagentes universal que abrange uma ampla gama de amostras, compatível com diferentes fluxos de trabalho. A extração automatizada reduz drasticamente os erros de manuseamento uma vez que a preparação de amostras é simplificada. O equipamento possui protocolos de extração pré-programados facilitando a sua configuração. (13)

São exemplos de amostras utilizadas frequentemente neste equipamento o sangue total, plasma, soro, exsudados nasofaríngeos/nasais, lavagem bromcoalveolar, urina, fezes, líquido cefalorraquidiano (LCR) e tecido fresco ou congelado. (13)

Este equipamento permite que sejam extraídos ácidos nucleicos de diferentes tipos de amostras (como os referidos anteriormente) apenas num processamento, utilizando o mesmo kit de extração e o mesmo protocolo. (13)

A purificação de ácidos nucleicos neste equipamento compreende várias etapas, ilustradas na Figura 1.



**Figura 1:** Esquema de etapas da purificação de ácidos nucleicos no sistema MagNA Pure 24. A etapa 1 consiste na lise da amostra, inativação de nucleases e libertação dos ácidos nucleicos; na 2 ocorre a adição de partículas magnéticas e a ligação dos ácidos nucleicos às mesmas; no passo 3 há a fixação das partículas magnéticas e do complexo de ácidos nucleicos de forma a que no passo 4 ocorram as múltiplas lavagens. Por fim no passo 5 dá-se a eluição dos ácidos nucleicos purificados. (13)

Inicialmente são removidas as impurezas da amostra utilizando o tampão de lavagem I que contém cloreto de guanidina, etanol e Tris-HCL, segue-se a digestão de proteínas com recurso à proteinase K acompanhada de glicerol e posteriormente, com a utilização de um tampão de lise, com tiocianato de guanidina, Tris-HCL e polidocanol, sucede-se a lise celular. Seguidamente as partículas magnéticas são adicionadas ocorrendo a sua ligação aos ácidos nucleicos. Após estas etapas é realizada a remoção de impurezas com o tampão de lavagem II, tendo na sua constituição etanol e acetato de sódio e em seguida ocorre uma nova purificação para remover impurezas com um tampão de lavagem III à base de acetato de sódio. Posteriormente os ácidos nucleicos são eluídos num tampão de eluição com Tris-HCL. (13)

### 2.1.2. KingFisher Flex

A extração de ácidos nucleicos no KingFisher Flex baseia-se na transferência automatizada de partículas magnéticas, utilizando hastes magnéticas cobertas por um pente descartável e diferentes placas contendo os reagentes para o processo de extração. Não recorre a mecanismos de aspiração e/ou dispensação. As amostras e reagentes, incluindo as partículas magnéticas, são distribuídos nas diferentes placas, com auxílio de micropipetas, de acordo com o as instruções do fabricante. O equipamento dispõe de protocolos previamente programados de forma a facilitar a utilização. (14)

A extração de ácidos nucleicos divide-se em 4 etapas.

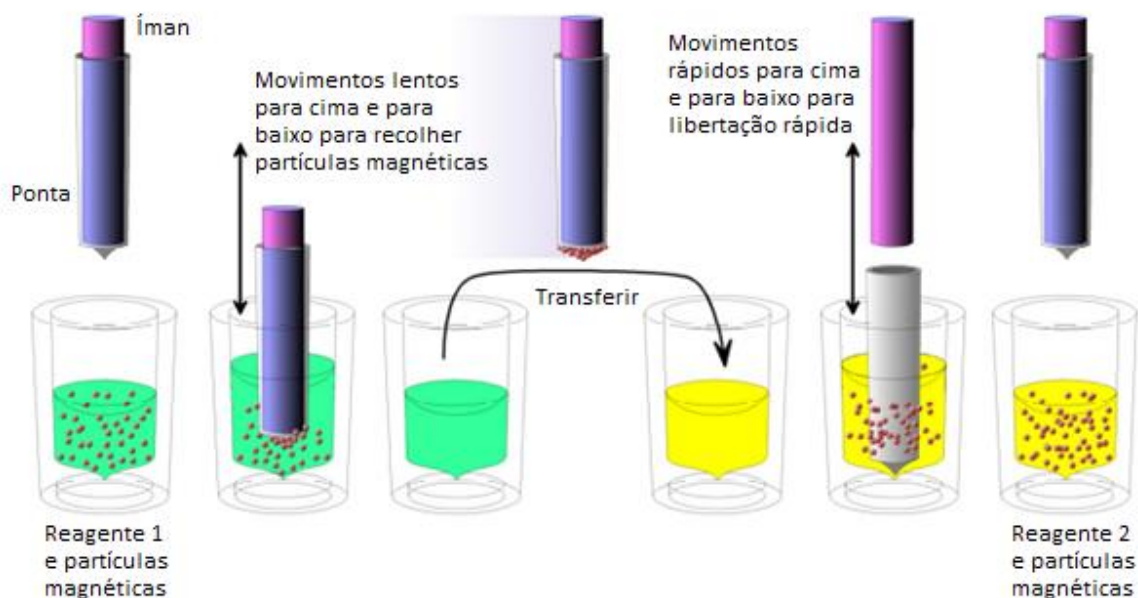


Figura 2: Esquema da transferência de partículas magnéticas de um poço para outro. Adaptado de (14)

Inicialmente a amostra é colocada num poço de uma placa onde já se encontram as esferas magnéticas e o reagente *binding* que irá contribuir para a lise da amostra, assim como a proteinase K. Nesta primeira

etapa as partículas magnéticas são envolvidas na amostra às quais se ligam os ácidos nucleicos de interesse com movimentos verticais do pente. São posteriormente removidas dos poços as esferas magnéticas que carregam os ácidos nucleicos e transferidas para a próxima placa. O passo de lavagem das partículas magnéticas, pela sua relevância é repetido 2 vezes, com reagentes diferentes. Na fase de libertação das partículas magnéticas os ímans separam-se do pente que mergulha no reagente seguinte e liberta a amostra com movimentos verticais do pente, fazendo uma lavagem com uma solução de lavagem (figura 2). Em seguida as esferas magnéticas juntamente com os ácidos nucleicos são transferidos para poços com etanol a 70% para uma nova lavagem. Por fim são transferidos para o reagente de eluição, onde ficam apenas os ácidos nucleicos de interesse puros sem as esferas magnéticas. (15)

## **2.2. Amplificação de Ácidos Nucleicos**

A amplificação de ácidos nucleicos consiste na replicação consecutiva de quantidades mínimas de DNA e/ou RNA originando uma quantidade de ácidos nucleicos suficientes para posterior análise. (16) A PCR permite amplificar um fragmento específico replicando *in vitro* o que acontece no interior das células. A amplificação de ácidos nucleicos permite detetar características de um microrganismo e identificá-lo evitando recorrer, por exemplo, a cultura microbiológica. Estas técnicas tornam-se uma mais valia particularmente para microrganismos de difícil crescimento e identificação.

A técnica de PCR é considerada uma das mais importantes invenções da ciência, sendo atualmente uma das técnicas mais utilizadas nos laboratórios de biologia molecular. (16,17) A possibilidade de determinada região do genoma de qualquer organismo ser multiplicada em milhões de cópias, facilita a análise genética e permite o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico muito mais sensíveis e mais específicas em comparação com as técnicas tradicionais utilizadas. (9)

A alta sensibilidade, especificidade, facilidade de execução e a possibilidade de analisar um elevado número de amostras simultaneamente fazem da técnica de PCR uma opção valiosa para estudos epidemiológicos e para identificação de microrganismos causadores de doenças. (9)

O sucesso da técnica de PCR reside na capacidade que esta tem em amplificar uma sequência precisa de DNA de uma forma simples, rápida, específica, sensível e versátil. O DNA alvo não precisa de ser isolado para ser amplificado, mesmo que este se encontre numa amostra com outro DNA estranho, visto que a especificidade da PCR é dada pelos *primers*. (18)

A PCR não é uma técnica livre de desvantagens, exige equipamentos específicos, espaço adequado e profissionais especializados. (19) Apresenta algumas limitações como: a) a necessidade de conhecer

antecipadamente a sequência de DNA a amplificar (9,18), b) no decorrer da PCR, como a Taq polimerase não tem a capacidade de correção de erros comuns às DNA polimerases (atividade de exonucleases 3'→5') introduz alguns erros, ainda que poucos e c) sujeita a contaminações, podendo haver amplificação devido à presença de DNA estranho, proveniente de uma contaminação. (20)

Outros fatores que podem afetar a PCR são a quantidade, pureza e qualidade do DNA alvo, pureza dos nucleótidos e a concentração de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), visto que diferentes concentrações de dNTP's podem levar à redução da fidelidade da DNA polimerase. (18)

No entanto, as técnicas de PCR têm tido um desenvolvimento notável. Atualmente para além da existência de novos equipamentos sofisticados, já foram desenvolvidas ferramentas que permitem ultrapassar as desvantagens elencadas, por exemplo a utilização de polimerases com atividade *proofreading* ou o desenvolvimento de estratégias para evitar contaminações com produtos amplificados. (20)

Numa reação de amplificação, de forma geral, a mistura de reação denominada de *Master Mix* contém o DNA com a sequência alvo a ser amplificada, DNA polimerase, oligonucleótidos iniciadores (*primers*), dNTP's, solução tampão e cloreto de magnésio. (20–22)

A DNA polimerase é uma enzima que sintetiza uma nova cadeia de DNA, complementar a uma cadeia molde. É selecionada consoante os objetivos do ensaio e tem como critério base a necessidade de ser termoestável. (23) A mais conhecida é a Taq polimerase (isolada a partir da bactéria termófila *Thermus aquaticus*) com atividade de polimerização 5'→3', resistente à desnaturação por ebulição e capaz de ser eficiente a uma temperatura ótima entre 70°C a 80°C. Esta enzima permite que se realizem vários ciclos de replicação sem que perca a sua capacidade. (17)

Existem mais alternativas à Taq polimerase, e atualmente há uma versão recombinante proveniente do gene de *T. aquaticus* expresso em *E. coli*. (24)

A concentração de *primers* na mistura de PCR pode afetar o resultado, ou seja, baixa concentração pode levar a uma má polimerização, concentração alta pode promover o aparecimento de produtos inespecíficos e formar dímeros de *primers*. (1,22)

A PCR é uma reação baseada em ciclos de variação de temperatura, o que torna este fator fundamental e de cálculo estritamente necessário para que as devidas reações ocorram no tempo certo. A temperatura no qual 50% dos pares de base de um DNA em cadeia dupla estão separados em cadeia simples é conhecida como temperatura de *melting* ( $T_m$ ). A  $T_m$  ou temperatura de fusão de um *primer* é influenciada pelo seu tamanho, concentração e composição e é calculada segundo a Regra de Wallace:  $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$ , em que A, T, C e G são o número de cada um dos nucleótidos no primer. Com a



determinação da  $T_m$  é possível definir a temperatura de *annealing*, que corresponde à temperatura em que se dá a ligação dos *primers*, normalmente é inferior à  $T_m$  2 a 4°C. (1,22,23)

Os dNTP's são parte fundamental na reação de PCR, pois são eles os elementos que formam a nova cadeia complementar.(24)

O ião  $Mg^{2+}$  é um co-fator essencial para que a DNA polimerase seja ativada e é adicionado à mistura de reação na forma de  $MgCl_2$ . A concentração de magnésio na reação deve ser calculada de forma a não ser excessiva, pois torna a PCR pouco específica, nem escassa, pois originará quantidades reduzidas de produto final. (1,22) A solução tampão é utilizada para equilibrar o pH durante a reação. (24)

A PCR é um método baseado em alterações de temperatura ao longo de 25-35 ciclos. Cada um destes é constituído por 3 fases: desnaturação, hibridização/*annealing* e extensão. (9,16,23)

A primeira etapa, de desnaturação, tem como objetivo desnaturar (separar) a cadeia molde de DNA, rompendo as ligações de hidrogénio, originando moléculas de DNA de cadeia simples. (24) A desnaturação dá-se pelo aumento da temperatura, normalmente acima dos 90°C. (1) A temperatura de desnaturação está relacionada com o conteúdo da cadeia de DNA, maior quantidade de nucleótidos G-C implica que se utilize uma temperatura mais alta para que seja possível quebrar todas as pontes de hidrogénio. (1,23,24)

A fase de *annealing* consiste na diminuição da temperatura para que os *primers* se possam ligar às sequências complementares no DNA molde de cadeia simples, resultante da etapa anterior. A temperatura de *annealing*, como referido anteriormente é ligeiramente mais baixa do que a  $T_m$ . (9,16)

A última etapa de cada ciclo corresponde à fase de extensão, que recorre ao aumento da temperatura para ativar a DNA polimerase. A enzima reconhece os primers ligados ao DNA alvo e liga-se a eles sintetizando a cadeia complementar. A síntese ocorre apenas na direção 5'→3' na qual são utilizados os dNTP's livres na mistura de reação. (1) Estas etapas são todas repetidas durante vários ciclos (figura 3).

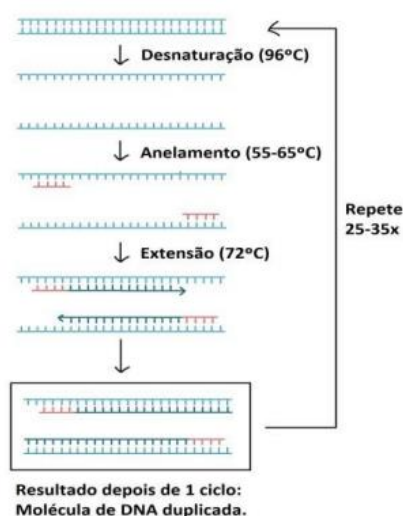


Figura 3: Esquema do comportamento da molécula alvo de DNA durante a PCR (25)

A temperatura e o tempo de cada etapa podem ser adaptados de forma a otimizar o protocolo a utilizar. (1) Depois de terminado o primeiro ciclo de PCR obtém-se duas novas cadeias de DNA por cada sequência alvo. Com a repetição dos ciclos há um aumento exponencial do número de sequências. O número de ciclos não deve de ser exagerado pois diminui a especificidade da reação. (9,18)

A técnica de PCR requer um equipamento, termociclador, capaz de atingir as variações de temperaturas que o protocolo exige em segundos. (24)

Após a realização da PCR, uma das formas de determinar a presença e o tamanho do produto da reação é através de eletroforese em gel. Esta técnica consiste na separação de moléculas pelos diferentes tamanhos e cargas que quando comparados com marcadores moleculares conhecidos nos dão a informação pretendida. (26) Um dos géis mais conhecidos é o gel de agarose, mas existem outros como por exemplo o gel de poliacrilamida, estes são selecionados em função da amostra a analisar. (27)

A técnica de PCR tem cada vez mais influência no diagnóstico de infeções provocadas por vírus, bactérias, fungos e protozoários (23) e com o evoluir da ciência foram surgindo algumas variantes da PCR, como a PCR em tempo real, *Nested PCR*, *Multiplex PCR*.

### **2.2.1. PCR em tempo real**

A PCR em tempo real é uma evolução da PCR convencional, e distingue-se pela capacidade de monitorizar a reação no momento em que ela ocorre. A fase de amplificação, deteção e quantificação ocorrem em simultâneo de forma automatizada. (28) O acompanhamento em tempo real da PCR permite identificar o ponto no tempo em que a amplificação de um alvo é detetada pela primeira vez. Quanto maior for a concentração do ácido nucleico de interesse, mais cedo é detetado o aumento de fluorescência, em oposição à PCR convencional que apenas permite a deteção no final da reação. (29,30)

A análise dos produtos de amplificação da PCR em tempo real apenas se concretiza recorrendo a compostos fluorescentes. São diversos os métodos de deteção na PCR, mas todos têm em comum a utilização de um composto fluorescente capaz de ser detetado pelo laser do termociclador durante a reação. Distinguem-se de uma forma geral como compostos intercalantes ou sondas de sequência específica. (1)

A deteção pelo SYBR® Green utiliza um conjunto de moléculas com capacidade de se ligar de forma covalente e não específica a cadeias duplas de DNA. Quando estas moléculas compostas por fluorocromos são excitadas pela luz do termociclador emitem fluorescência que é detetada pelo mesmo. (31) No início da reação a fluorescência será mínima, visto que as moléculas de SYBR® Green se encontram livres na solução. Com o decorrer da reação e o aumento de ligações de fluorocromos às

cadeias duplas de DNA, que vão sendo formadas pela enzima *Taq* DNA polimerase, dá-se um aumento de fluorescência que é detetada e registada. (32)

Este método de deteção tem 3 grandes vantagens, sendo elas a sua grande sensibilidade, a facilidade de manuseamento e o baixo custo. No entanto, é muito pouco específico e liga-se a qualquer fragmento de cadeia dupla, como por exemplo os dímeros de *primers*.(32)

A tecnologia TaqMan® recorre a sondas de hidrólise para detetar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados durante a PCR. Nesta tecnologia, são utilizados dois *primers* específicos e uma sonda TaqMan® homóloga à região do fragmento de DNA entre os *primers*. (1)

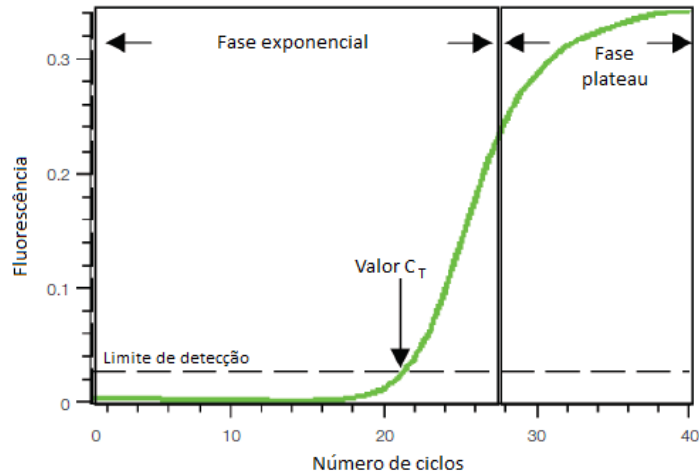
A sonda exibe na extremidade 3' um *quencher*, ou seja, uma molécula que absorve e dissipa em forma de calor a energia emitida pela molécula repórter presente na extremidade 5' quando a sonda está intacta. (28,33,34) Quando ocorre a hibridização as sondas ligam-se à sequência alvo com a qual tem complementaridade. Na fase seguinte a enzima *Taq* DNA polimerase hidrolisa a sonda devido à sua atividade exonucleotídica 5'-3', dando-se a separação do *quencher* e da molécula repórter. Com o aumento da distância o *quencher* deixa de conseguir absorver a fluorescência do fluorocromo que passa a ser emitida para o meio e detetada pelo termociclador. (28,35)

Esta tecnologia permite a amplificação de duas sequências diferentes no mesmo ensaio, utilizando duas sondas marcadas com fluorocromos diferentes. É um método muito específico, sensível e preciso. Em contrapartida é uma técnica dispendiosa e complexa, pois exige que a amplificação e a hidrólise sejam eficientes. (31,36)

Outra metodologia utilizada são as sondas de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET, do inglês *Fluorescent Resonance Energy Transfer*) que utiliza duas sondas, uma que contém um fluorocromo na extremidade 3' e a outra na extremidade 5', desenhadas para que se liguem a alvos adjacentes. Quando se dá a hibridização e os dois fluoróforos ficam próximos, o fluoróforo dador liberta energia e excita o recetor que dissipa essa energia em forma de fluorescência. Este último fluoróforo apenas emite fluorescência quando se encontra hibridizado na sequência alvo junto ao dador, a fluorescência aumenta consoante se ligam as sondas ao alvo. Deste modo é possível quantificar DNA em função da fluorescência. (1,5,35)

As sondas de hibridização como as FRET têm uma elevada especificidade, pois depende da hibridização das duas sondas independentes na sequência alvo para ser detetada fluorescência. (37)

Recorrendo à PCR em tempo real é possível acompanhar o desenvolvimento da reação ao longo das 2 grandes fases: a fase exponencial e a fase *plateau* (figura 4). (38)



**Figura 4:** Representação gráfica de uma curva de reação de PCR em tempo real e as suas fases. Adaptado de (38)

A fase exponencial corresponde à primeira fase em que a amplificação é de alta eficiência, e inicia a emissão de fluorescência que é detetada desde o início da reação. A fase seguinte é de crescimento linear, onde ocorre um decréscimo da eficiência pela baixa concentração de reagentes que vão sendo consumidos e ficando menos disponíveis ao longo da reação. Com a escassez de reagentes a reação acaba por atingir a fase *plateau*/estacionária, deixando de ser possível continuar a aumentar o produto de PCR. (21,31,37)

Na interpretação dos resultados disponibilizados pelo equipamento de PCR é necessário ter em conta os conceitos de *baseline*, *threshold* e *cycle threshold* ( $C_T$ ). A *baseline* é o limiar de deteção de fluorescência do equipamento, de forma a eliminar o “ruído de fundo”. O *threshold* é o limite a partir do qual a fluorescência detetada ultrapassa o limiar da fase exponencial. O *threshold* está relacionado com o *cycle threshold*, sendo este o número de ciclos correspondente ao ponto em que a curva de amplificação ultrapassa o limite de deteção. O valor de  $C_T$  é correlacionável com o número de moléculas de DNA amplificadas. (39)

### 2.2.2. **Nested PCR**

A *nested PCR* é uma variante de PCR utilizada quando se pretende aumentar a sensibilidade e/ou especificidade. Esta técnica consiste na realização da PCR em duas etapas, com diferentes pares de *primers*. A primeira reação resulta num aumento da quantidade de DNA existente na amostra com um conjunto de *primers* externos, e o seu produto é utilizado como molde para a segunda reação que utiliza um pare de *primers* internos. (40–43)

A *nested PCR* é um método eficiente, mas requer o conhecimento da sequência alvo.(41)

Esta técnica pela sua sensibilidade e especificidade é utilizada em várias situações, como por exemplo na detecção de vários tipos de agentes patogénicos em amostras clínicas e análise genética de impressões digitais. (44,45)

### **2.2.3. Multiplex PCR**

A *multiplex* PCR é uma técnica que consiste em utilizar múltiplos pares de *primers* de forma a amplificar mais de uma sequência de DNA na mesma reação. Com recurso a várias sondas, cada uma marcada com um corante fluorescente único na reação, é possível identificar e quantificar as diferentes sequências alvo a serem amplificadas no mesmo ensaio. (46–48)

A otimização de um protocolo de *multiplex* PCR é considerada uma tarefa complexa por exigir que sejam cumpridos os critérios necessários para cada uma das reações de PCR individualmente. (10)

Esta técnica tem como vantagem a rapidez com que se obtêm os resultados e a possibilidade de economizar nos reagentes, quando comparada às diferentes reações que se teria de fazer para cada alvo individualmente. (10,49)

A *multiplex* PCR pode ser utilizada em diferentes casos, por exemplo para diagnóstico de meningites/encefalites, infeções por vírus respiratórios e análise de polimorfismos bialélicos autossomais. (46,48,50–53)

### 3. Comparação dos imunoenaios BioMaxima e mariPOC de *Clostridium difficile*

A implementação de um método de análise já comercializado e descrito na literatura passa por um processo de avaliação para garantir a qualidade e estimar a sua eficiência na rotina do laboratório, ou seja, passa pelo processo de validação metodológica. (54)

A validação de métodos permite garantir que as análises de rotina originam resultados consistentes quando comparados a resultados de referência, isto é possível através da análise de vários parâmetros como a sensibilidade, especificidade, precisão, exatidão e repetitividade. Este é um processo moroso mas necessário para considerar um método confiável. (54–56)

Durante o período de estágio foram testados e analisados dois métodos de diagnóstico de *C. difficile*, método imunocromatográfico – BioMaxima (teste rápido) e método de fluorescência de excitação de dois fótons (TPX – do inglês Two-Photon Excitation) – mariPOC. Esta avaliação foi realizada devido à proposta de fornecedores de testes de diagnóstico do Hospital de Braga que ofereceram alguns exemplares para o projeto.

#### 3.1. *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* é uma bactéria Gram positivo anaeróbia, formadora de esporos, o que possibilita a persistência nos doentes e no ambiente, facilitando a sua disseminação pela via fecal-oral. (57) Esta bactéria é a principal responsável por diarreia infecciosa associada aos cuidados de saúde em países desenvolvidos. (58,59) Algumas estirpes da bactéria produzem 2 tipos de toxinas: a toxina A (TcdA) e a toxina B (TcdB), que podem provocar colite pseudomembranosa. As toxinas estimulam a expressão epitelial da interleucina 8 (IL-8) e de ICAM-1, mediadores de inflamação, necrose celular e de perda de proteínas. (60)

Existem também algumas estirpes de *C. difficile* que não produzem nenhum tipo de toxina, consideradas avirulentas. (61)

Das 2 toxinas, a TcdB é o principal fator de virulência causando dano às células do hospedeiro de forma mais eficiente do que a TcdA. (62) Para além das 2 grandes toxinas TcdA e TcdB, codificadas pelo gene *tcdA* e *tcdB* respetivamente, localizados no *locus* da patogenicidade (PaLoc), existem algumas estirpes que produzem a toxina binária CDT. A toxina binária é codificada por dois genes, *cdtA* e *cdtB*, localizados no locus CDT (CdtLoc). (63) O locus de patogenicidade (PaLoc) também contém genes que codificam para reguladores da expressão da toxina, como por exemplo o *tcdC* que codifica o regulador negativo da expressão da toxina. (64)

A flora bacteriana intestinal de um adulto saudável é geralmente resistente à colonização por *C. difficile*. No entanto, quando ocorre alteração desta flora normal essa resistência diminui. O principal fator de risco que provoca essa alteração é a exposição aos antibióticos (57,61), contudo são também fatores de risco a idade avançada, o sistema imunológico comprometido e o internamento hospitalar. (58)

Os sintomas da infecção por *Clostridium difficile* podem variar de diarreia leve a colite pseudomembranosa, sendo características da doença a inflamação, a diarreia e lesões necróticas no epitélio do cólon. (64,65)

A colite pseudomembranosa está geralmente associada à infecção por *C. difficile*, no entanto há outras etiologias menos comuns que podem estar na origem da doença, como por exemplo infecção viral por citomegalovírus. (61)

### **3.2. Diagnóstico Laboratorial**

A descoberta da infecção por *C. difficile* como causadora principal de colite pseudomembranosa contribuiu para a evolução dos testes laboratoriais específicos para diagnóstico. (61)

Diretrizes práticas enfatizam que as populações alvo de testes de *C. difficile* são pacientes com fezes não formadas. (66) No entanto, a abordagem ideal baseada em laboratório ainda é uma questão de debate e controversa. (67) Uma vez que a diarreia é um sintoma clínico que pode ser provocado por diferentes agentes patogénicos, para além do *C. difficile*, é fundamental selecionar o(s) teste(s) laboratorial(ais) mais adequado(s). (68) Existe uma variedade de métodos para diagnosticar a infecção por *C. difficile*, podendo ser divididos em 2 grupos. Um grupo deteta a presença de um antígeno, como a enzima glutamato desidrogenase (GDH), presente em larga escala em amostras com *C. difficile*, ou o próprio organismo (ou um componente do mesmo), como a cultura bacteriana anaeróbica e testes de ácidos nucleicos que detetam genes que codificam as toxinas A e B. O outro grupo deteta toxinas livres, como ensaios de neutralização da citotoxicidade em cultura de células e imunoenaios enzimáticos (EIAs). (66) A maioria dos métodos atuais de diagnóstico laboratorial envolve a deteção das toxinas TcdA e TcdB. (69)

As guidelines para diagnóstico de *C. difficile* recomendam a realização de um teste de triagem que detete a presença da proteína GDH e das toxinas A/B. Um resultado positivo para GDH e toxinas A/B confirmam a presença de uma infecção por *C. difficile*, o resultado negativo confirma a sua ausência. Em situações em que a proteína GDH está presente mas não são detetadas toxinas é necessário realizar um teste de amplificação de ácidos nucleicos ou cultura toxigénica. Estes testes são utilizados para diagnóstico de estirpes toxigénicas. (70)

Os testes de referência para diagnóstico de infecção por *C. difficile* (ICD) são o teste de neutralização da citotoxicidade celular (CCNA) e a cultura toxigénica (TC). Estes testes de referência são morosos e por isso

não são utilizados rotineiramente na maioria dos laboratórios de diagnóstico. (71) Muitos hospitais não possuem instalações e recursos suficientes para isolar todos os pacientes com fezes moles, portanto, um ensaio sensível e rápido é uma prioridade para excluir os pacientes que não precisam de isolamento e priorizar recursos para os que precisam. (72)

O método de triagem para suspeitas de infecção por *C. difficile* são os testes EIAs para pesquisa de GDH e das toxinas A/B. Um resultado positivo para ICD é aceite se o teste EIA for positivo para GDH e toxinas A/B. Um resultado é considerado negativo no caso de o teste ser negativo para GDH e toxinas A/B. O teste confirmatório de PCR de deteção do *tcdB* pode ser usado se os resultados dos testes EIA forem discordantes (positivo para GDH e negativo para toxinas A/B). (73) Este método de triagem é o utilizado no Hospital de Braga como rotina, recorrendo ao teste imunocromatográfico *TECHLAB C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®*.

Sabe-se que estirpes TcdA negativas e TcdB positivas podem ser encontradas em pacientes que apresentam infecção por *C. difficile*. No entanto não foram identificadas estirpes TcdA positivas e TcdB negativas. (74) Por esta razão se utiliza a PCR de *tcdB* quando surgem dúvidas nos testes EIA.

Existem atualmente no mercado outros testes, como o mariPOC. Este teste permite a deteção simultânea de GDH e toxinas A e B. O teste mariPOC é um imunoensaio de fluorescência automatizado, baseado numa técnica de ensaio de excitação de dois fótons. (62)

Devido à complexidade do diagnóstico de *C. difficile* em ambiente hospitalar começa a ser necessária a avaliação de diferentes métodos de diagnóstico. A utilização de métodos mais sensíveis e específicos levam a uma redução de custos e de tempo de espera para iniciar tratamento. Esta é uma necessidade urgente visto que isolar todos os utentes com sintomatologia enquanto aguardam um diagnóstico laboratorial é impraticável.

### **3.2.1. TECHLAB – C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®**

O teste rápido *TECHLAB C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®* é um ensaio imunoenzimático de membrana para a deteção do antigénio glutamato desidrogenase (GDH) e das toxinas A e B do *Clostridium difficile*. A deteção de GDH permite confirmar a presença da infecção por *C. difficile*, e a deteção de toxina A/B indica a presença de *C. difficile* toxigénico em amostras fecais. (75)

Este teste utiliza anticorpos específicos do glutamato desidrogenase e das toxinas A e B do *C. difficile*. O ensaio é realizado num dispositivo de membrana que contém linhas de teste para o antigénio, para as toxinas e para controlo. A linha de teste do antigénio contém anticorpos contra glutamato desidrogenase do *C. difficile*, a do controlo contém anticorpos antiperoxidase de rábano (HRP) e a linha das toxinas



contém anticorpos contra toxinas A e B do *C. difficile*. O reagente conjugado utilizado é composto por anticorpos da glutamato desidrogenase e anticorpos das toxinas A e B acompanhadas de peróxido de rábano. (75)

Esta técnica, de acordo com o fabricante apresenta elevada sensibilidade analítica e reprodutibilidade, para além de ser um teste prático e economicamente acessível.

### **3.2.2. mariPOC® – Gastro and CDI**

O mariPOC® é um equipamento *point-of-care* baseado na tecnologia de deteção de fluorescência de excitação de dois fotões (TPX). A tecnologia TPX é simples de utilizar, com baixo consumo de reagentes e alta capacidade de produção. (76)

A elevada especificidade resulta do princípio do imunoensaio *sandwich*, aperfeiçoada pelo uso de micropartículas de poliestireno, como fase sólida da reação. A fluorescência excitada por laser das micropartículas individuais é medida uma de cada vez, bem como o sinal de fluorescência da matriz circundante para uma eliminação eficiente de interferências da matriz. Para aumentar a precisão a fase sólida é replicada dentro de um poço de reação individual com milhares de partículas. (76)

### **3.2.3. BioMaxima – Clostridium difficile GDH A+B**

O *Clostridium difficile* GDH A+B da BioMaxima é um teste rápido imunocromatográfico qualitativo para diagnóstico de *C. difficile* pela deteção da proteína GDH e das toxinas A e B individualmente em amostras de fezes.

O ensaio é constituído por 3 janelas de teste cada uma com o seu controlo. A faixa reservada à deteção de GDH consiste numa membrana de nitrocelulose com anticorpos monoclonais de camundongo contra a proteína GDH e com uma linha de controlo com anticorpos policlonais de coelho contra uma proteína específica semelhante em todas as faixas de teste. A almofada onde é depositada a amostra para se dar início ao teste contém anticorpos anti-GDH conjugados com uma solução vermelha e uma proteína de ligação específica para controlo.

A faixa destinada à identificação da toxina A é semelhante à anterior, mas com anticorpos contra a toxina A e com o mesmo tipo de controlo. Na almofada difere da anterior apenas nos anticorpos que são anti-toxina A. (77)

A faixa para deteção da toxina B é semelhante às anteriores, tendo apenas a alteração de anticorpos, sendo anticorpos contra a toxina B, com o controlo igual às faixas já referidas, e com anticorpos anti-toxina B na almofada. (77)

Se a amostra for positiva, o antigénio da amostra (GDH, toxina A e/ou toxina B) liga-se ao anticorpo específico (anti-GDH, anti-toxina A e/ou anti-toxina B) e por ação capilar percorrem a janela de teste. Os anticorpos na linha de teste vão capturando o antigénio correspondente, juntamente com o conjugado de cor vermelha, realçando as linhas que permitem identificar o resultado como positivo. Independente do resultado da amostra é fundamental o aparecimento das 3 linhas verdes de controlo para validar o teste. (77)

Este teste pode ter algumas limitações influenciadas por diferentes fatores que invalidam o teste, por exemplo o excesso de amostra, a conservação e a concentração de antigénio na amostra que poderá não ser suficiente para ser detetada. (77)

#### **3.2.4. PCR em tempo real de *tcdB***

A toxina TcdB é o principal fator de virulência causando problemas nas células do hospedeiro, e segundo a literatura é possível encontrar infeções por *C. difficile* desprovidas da toxina A, mas contendo a toxina B, enquanto que o oposto não acontece. (74)

A presença da toxina B nas amostras pode ser realizada por PCR em tempo real. As técnicas de PCR não têm sido amplamente utilizadas para analisar amostras de fezes pelo desafio na extração de ácidos nucleicos neste tipo de amostras. (78)

### **3.3. Objetivo**

O objetivo deste trabalho foi comparar os imunoensaios BioMaxima® e mariPOC® para diagnóstico de infeção por *C. difficile* com o imunoensaio TECHLAB C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® implementado no Hospital de Braga.

#### 4. Metodologia

O Hospital de Braga recebe diariamente amostras para testar a presença de *C. difficile* toxigénica em amostras de pacientes com diarreia ou suspeita de infeção por *C. difficile* por contacto com outros infetados ou por tratamento com antibióticos. Estas amostras foram submetidas ao teste de rotina implementado no momento no laboratório do Hospital de Braga, o teste C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®, TECHLAB, Inc., EUA, permitindo a obtenção do diagnóstico. Entre outubro de 2021 e janeiro de 2022, foram selecionadas aleatoriamente 46 destas amostras para integrarem o presente estudo observacional descritivo transversal.

Todas as amostras selecionadas foram congeladas a -20°C para posterior utilização. Aquando da realização de cada um dos testes em estudo as mesmas foram descongeladas à temperatura ambiente.

Conforme referido anteriormente as 46 amostras utilizadas neste projeto foram testadas pelo imunoensaio implementado no laboratório, contudo, face à limitação de número de testes disponíveis para o projeto, apenas foi possível testar 34 dessas amostras pelo protocolo *Gastro and CDI* do mariPOC®, ArcDia International Oy Ltd., Finlândia, e 16 dessas amostras (incluídas nas 34 anteriores) pelo imunoensaio *Clostridium difficile* GDH A + B da BioMaxima S.A., Polónia. Uma vez que, em caso de resultados duvidosos no Hospital de Braga é realizada uma PCR em tempo real para deteção de *tcdB*, como confirmatório, todas as 46 amostras utilizadas neste estudo foram submetidas a esta PCR.

Para o método implementado no laboratório, TECHLAB – C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®, os testes foram realizados normalmente, seguindo as normas já estabelecidas no laboratório. De acordo com o fabricante as amostras deverão ser processadas em menos de 24 horas, no entanto podem ser armazenadas entre 2°C e 8°C por 72 horas ou abaixo de -10°C se for necessária a sua preservação por mais de 72 horas. (75)

No processamento, são diluídos 25 µL de amostra em 750 µL de diluente e é adicionada uma gota de conjugado. Esta mistura é colocada na cassete onde fica a incubar. Quando termina o período de incubação faz-se uma lavagem com tampão de lavagem fornecido no kit, seguido da adição de substrato (solução com tetrametilbenzidina) que fica a incubar. Terminando esta fase de incubação é possível observar o resultado pelo aparecimento de linhas azuis que dependendo da sua localização indicam a presença de *C. difficile* toxigénica ou não. (75)

No ensaio do equipamento mariPOC®, com o protocolo *Gastro and CDI*, as amostras são estáveis durante 24 horas, no entanto, quando necessário, pode-se prolongar a sua estabilidade acima de 24 horas, congelando-as, evitando ciclos de descongelamento. (79)

Para esta análise, as amostras de fezes, com ajuda de uma zaragatoa são previamente diluídas em 2,6 mL de tampão e filtradas antes do seu processamento no mariPOC®. Após a disponibilização da amostra

tratada no equipamento, esta é dispensada de forma automática em poços de reação que já contém os reagentes liofilizados, com agitação para os dissolver. (79)

O resultado é emitido automaticamente pelo equipamento, sendo possível ter resultados positivos em 20 minutos. Contudo, resultados negativos e positivos baixos necessitam sempre de 2 horas de processamento. (79)

De acordo com o fornecedor, no teste de *Clostridium difficile* GDH A + B da BioMaxima as amostras após a colheita podem ser conservadas a temperaturas entre os 2°C e 8°C por 24 horas ou a -20°C se for necessária a sua preservação por um período mais longo. Não é recomendado que as amostras sejam congeladas e descongeladas várias vezes. No momento da realização da análise, a amostra deve estar à temperatura ambiente. (77)

No processamento são colhidas 125 mg da amostra com uma haste adequada e diluídas num tubo individual que já contém o volume necessário de diluente fornecido no kit. Após a diluição a amostra é homogeneizada e são adicionadas 4 gotas nos diferentes poços de amostra, dando-se início à migração da amostra sobre as janelas de teste. A leitura faz-se visualmente 10 minutos após iniciar a corrida. O resultado interpreta-se pela visibilidade das linhas de teste vermelhas nas diferentes janelas de teste, tendo em conta o aparecimento sempre das linhas verde nos locais de controlo. (77)

O “teste de ouro” utilizado no Hospital de Braga para esclarecer casos com resultados duvidosos é o PCR em tempo real para deteção do gene *tcdB*, permitindo identificar se na amostra está presente *C. difficile* toxigénica. As amostras utilizadas em PCR são previamente diluídas em água ultrapura, nessa solução, recorrendo ao MagNA Pure 24 realiza-se a extração e purificação dos ácidos nucleicos de interesse. Segue-se a preparação da Mix de reação com os reagentes da PCR em tempo real, água, tampão, DNA molde, nucleotídeos, MgCl<sub>2</sub> e DNA polimerase, ao qual se junta o eluado das amostras extraídas e se processa a análise no termociclador.

As amostras foram todas submetidas a esta análise de PCR em tempo real, no entanto na rotina do laboratório é utilizada apenas em caso de o teste descrito no algoritmo ser duvidoso.

Os resultados obtidos pelas metodologias em estudo mariPOC® e BioMaxima foram comparados com os resultados obtidos pela metodologia implementada no laboratório TECHLAB de forma a determinar os verdadeiros positivos (resultado positivo no teste em estudo e no teste TECHLAB), verdadeiros negativos (resultado negativo no teste em estudo e no teste TECHLAB), falsos positivos (resultado positivo no teste em estudo e negativo no teste TECHLAB) e falsos negativos (resultado negativo no teste em estudo e positivo no teste TECHLAB). Para cada um dos testes em estudo foi calculada a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) de acordo com o teste de McNemar, com as fórmulas de cálculo apresentadas:

$$S = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$E = \frac{VN}{VN + FP}$$

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

Em que:

S = Sensibilidade

E = Especificidade

VPP = Valor preditivo positivo

VPN = Valor preditivo negativo

VP = Verdadeiro positivo

VN = Verdadeiro negativo

FP = Falso positivo

FN = Falso negativo

Os resultados obtidos nos 3 ensaios (TECHLAB, mariPOC® e BioMaxima) foram ainda comparados com os resultados obtidos na PCR em tempo real para detecção de *tcdB*. Para esta comparação foram determinados os mesmos parâmetros referidos para a comparação anterior.

Os ensaios BioMaxima e mariPOC, assim como o PCR de *tcdB* não foram tidos em conta para diagnóstico de doença, apenas os resultados do teste da TECHLAB que está descrito no algoritmo de diagnóstico laboratorial foram relatados aos médicos e pacientes.

## 5. Resultados

No total, foram testadas 46 amostras por imunoensaio C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE® (TECHLAB) e por PCR em tempo real. Destas 46 amostras, 34 foram testadas com o *Gastro and CDI* (mariPOC) e 16 com o *Clostridium difficile* GDH A+B (BioMaxima).

Das 46 amostras testadas com o ensaio de rotina do laboratório 34 foram positivas para GDH e 12 foram negativas, para a presença de toxinas A/B, 21 foram positivas e 25 foram negativas.

Na tabela 1 encontram-se apresentados os resultados dos ensaios BioMaxima e mariPOC em função do ensaio de rotina TECHLAB. Podemos confirmar que o teste BioMaxima exibe a maior sensibilidade para a deteção da proteína GDH com valores de 100%. E o mariPOC apresenta melhores resultados de especificidade para a deteção da proteína GDH e das toxinas A/B (100%), assim como melhor sensibilidade para a deteção toxinas A/B, com 82%.

**Tabela 1:** Resultados dos imunoensaios realizados para a deteção de GDH e toxinas A/B em função do teste TECHLAB

Proteína	Teste	Número de amostras					Sensibilidade (%) (IC 95%)	Especificidade (%) (IC 95%)	VPP (%) (IC 95%)	VPN (%) (IC 95%)
		Total	VP	FP	VN	FN				
TECHLAB GDH	BioMaxima	16	12	1	3	0	100	75 (73,6–76,4)	92 (91,8–92,8)	100
	mariPOC	34	24	0	8	2	92 (92,0–92,6)	100	100	80 (79,2–80,7)
TECHLAB Toxina A/B	BioMaxima	16	4	2	9	1	80 (78,9–81,1)	82 (81,1–82,5)	67 (65,5–67,9)	90 (89,4–90,6)
	mariPOC	34	14	0	17	3	82 (81,8–82,9)	100	100	85 (84,5–85,5)

VP – verdadeiro positivo; FP – falso positivo; VN – verdadeiro negativo; FN – falso negativo; VPP – valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo; IC – intervalo de confiança

Na tabela 2 encontram-se apresentados os resultados dos diferentes ensaios em função da análise de PCR em tempo real para deteção do gene *tcdB*. No teste de PCR em tempo real não se confirmou sensibilidades nem especificidades de 100%, no entanto o teste TECHLAB e mariPOC apresentam maior sensibilidade com 88% comparativamente com o BioMaxima com 80%. A especificidade é maior no mariPOC com 94% e semelhante entre o TECHLAB e o BioMaxima com 91%.

**Tabela 2:** Resultados dos imunoenaios para a toxina B em função da análise PCR em tempo real

Gene	Teste	Número de testes					Sensibilidade (%) (IC 95%)	Especificidade (%) (IC 95%)	VPP (%) (IC 95%)	VPN (%) (IC 95%)
		Total	VP	FP	VN	FN				
PCR <i>tcdB</i>	TECHLAB	46	21	2	20	3	88 (87,0-87,9)	91 (90,5-91,2)	91 (90,9-91,6)	87 (86,5-87,3)
	BioMaxima	16	4	1	10	1	80 (78,9-81,1)	91 (90,4-91,5)	80 (78,9-81,1)	91 (90,4-91,5)
	mariPOC	34	15	1	16	2	88 (87,7-88,7)	94 (93,8-94,5)	94 (93,4-94,1)	89 (88,4-89,4)

VP – verdadeiro positivo; FP – falso positivo; VN – verdadeiro negativo; FN – falso negativo; VPP – valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo; IC – intervalo de confiança

## 6. Discussão

Neste estudo foram testados 2 imunoenaios com diferentes princípios para a detecção da proteína GDH e das toxinas A/B que permitem diagnosticar infecções por *C. difficile*. O *Clostridium difficile* GDH A+B da BioMaxima utiliza uma membrana de nitrocelulose onde é realizado o ensaio manualmente. Apesar de não existir estudos independentes referentes à análise da sensibilidade e especificidade deste teste, o fabricante apresenta dados relativos a estes parâmetros. De acordo com o fabricante este teste apresenta uma sensibilidade e especificidade superior a 99%, tanto para a detecção de GDH como das toxinas A/B, na comparação deste teste com o TECHLAB. (77) Neste estudo obteve-se uma sensibilidade para detecção de GDH de 100% e para detecção das toxinas A/B de 80%, sendo este último valor inferior ao descrito pelo fabricante. Relativamente à especificidade, neste estudo obteve-se para a proteína GDH um valor de 75% e para as toxinas A/B um valor de 82%, valores inferiores aos referenciados pelo fabricante do teste. (77) Também na comparação deste imunoenasão com o PCR em tempo real os valores obtidos foram inferiores ao esperado. (80–82)

O imunoenasão *Gastro and CDI* do mariPOC tem por base a tecnologia automatizada de excitação de dois fotões. É um ensaio já estudado para diagnóstico de infecção por *C. difficile* com 2 artigos publicados. (62,68) Comparativamente com estes estudos, que avaliaram o desempenho deste ensaio com o ensaio TECHLAB, e com os valores apresentados pelo fabricante, a sensibilidade obtida no nosso estudo (sensibilidade para GDH de 92% e toxinas A/B de 82%) foi inferior (sensibilidade de 98,8% para GDH e de 100% para toxinas A/B no estudo de ArcDia International Oy Ltd e de 94,7% para GDH e 81,6% para toxinas A/B no estudo de Salvolainen *et al.*). (62,68,83) Ao compararmos o ensaio mariPOC com a detecção por PCR foi obtida uma sensibilidade de 88%, valor este igual ao obtido na comparação do ensaio TECHLAB com o PCR. Os valores obtidos para a especificidade, encontrando-se de acordo com o descrito na literatura e pelo fabricante, para as toxinas A/B, tendo-se obtido 100% para cada detecção (GDH e toxina A/B) quando o teste de referência é o teste da TECHLAB e 94% quando comparado à análise PCR. Destaca-se que no caso específico da proteína GDH o valor de especificidade obtido, 100%, encontra-se 5% acima do referenciado em estudos (62,68,83) e ligeiramente acima do valor apresentado pelo fabricante (98,8%). (83)

Quando comparados entre si, os 2 imunoenaios apresentam discrepância em diferentes parâmetros. Na detecção de GDH o teste BioMaxima apresenta maior sensibilidade e valor preditivo negativo (100% para ambos), no entanto o teste mariPOC exibe maior especificidade e valor preditivo positivo (100% para ambos). Quanto à detecção das toxinas A/B o teste BioMaxima destaca-se apenas com melhor valor preditivo negativo. Na sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo o mariPOC apresenta melhores resultados.



Os testes BioMaxima e mariPOC apresentaram valores de VPP de 80% e 94%, respectivamente, para detecção de estirpes toxigênicas de *C. difficile*, demonstrando a sua diferente utilidade como teste de triagem. O teste de triagem pretende detetar potenciais doentes e é aplicado a um grande número de utentes sintomáticos ou assintomáticos que se encontrem em risco de doença. O teste de diagnóstico é aplicado em caso de necessidade de confirmar a presença/ausência da doença quando existem dúvidas perante o resultado do teste de triagem. Na escolha de um teste de triagem procura-se um valor alto de sensibilidade para que sejam detetados todos os positivos, e para diagnóstico é necessário um teste de elevada especificidade, para que possam ser identificados os falsos positivos e os verdadeiros negativos. (84)

A abordagem de diagnóstico mais adequada seria executar o teste mariPOC para detecção da proteína GDH e das toxinas A/B, seguido de PCR em tempo real para o gene *tcdB* nas amostras GDH positivas e toxinas negativas, se os sintomas clínicos indicarem a presença de infeção por *C. difficile*. (85) Amostras com resultado de PCR negativo para as toxinas devem ser testadas para outros agentes infecciosos. (71)

Um dos benefícios do teste mariPOC é a possibilidade de aceder a resultados semiquantitativos. O resultado pode ser utilizado para correlacionar dados entre a concentração de GDH e/ou toxinas A/B com o prognóstico clínico. (86)

Este estudo apresenta algumas limitações que podem justificar a discrepância de resultados relativamente à literatura. Uma das razões pode estar relacionada com o armazenamento das amostras e excessiva manipulação. No armazenamento das amostras optou-se por congelar a -20°C para que integrasse as condições comuns a todos os testes. Mas nem sempre as amostras utilizadas cumpriram os critérios de armazenamento indicados, visto que foram submetidas a mais do que um ciclo de descongelação, pela falta de oportunidade de processar os diferentes testes no mesmo dia, tendo sido por isso manipuladas várias vezes. Este contexto pode ter causado contaminações entre amostras na preparação de algum dos ensaios ou até mesmo degradação de ácidos nucleicos. O baixo número de amostras testadas pode também ter influenciado os resultados obtidos quando comparados a estudos com uma amostragem superior. O n amostral também não foi o mesmo para cada ensaio, visto que os testes em estudo foram testes que os diferentes fornecedores disponibilizaram gratuitamente para a realização deste estudo.

## 7. Conclusão

O estágio foi concluído no tempo previsto com sucesso perante as expectativas e objetivos traçados inicialmente. Foi possível integrar, na prática, a rotina do laboratório consolidando os conhecimentos teóricos, desenvolver autonomia na realização de ensaios moleculares de forma independente e aperfeiçoar as competências e rigor na interpretação e avaliação dos diferentes resultados obtidos de acordo com a metodologia aplicada.

No decorrer do estágio foi possível desenvolver o projeto de comparação de métodos de diagnóstico de *C. difficile*. A detecção de paciente com infecção por *C. difficile* é fundamental devido á sua prevalência em ambientes hospitalares.

Ambos os imunoenaios testados neste projeto permitem a detecção de GDH e das toxinas A/B simultaneamente utilizando a mesma amostra, desta forma estão os dois aprovados como algoritmo alternativo para diagnóstico de *C. difficile*.

Na detecção da toxina B os testes TECHLAB, BioMaxima e mariPOC têm valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo semelhantes. No entanto no conjunto de parâmetros analisados, o método do mariPOC ganha algum destaque pelos seus resultados. Têm também a grande vantagem de ter a interpretação de resultados automatizada e a gravação dos mesmos. Os outros testes perdem pela interpretação que pode ser influenciada pelo operador. O facto de ser um método automatizado também é vantajoso, a manipulação da amostra é mais controlada, enquanto os outros testes dependem da cronometragem de tempo para interpretação de resultados.

Face ao constante desenvolvimento de novas metodologias para diagnóstico, é fundamental que os laboratórios realizem estudos como este, antes da implementação de uma nova metodologia, de forma a que cada laboratório possa garantir a qualidade dos seus resultados.

## 8. Referências Bibliográficas

1. Pelt-Verkuil E van, Belkum A van., Hays JP. Principles and technical aspects of PCR amplification. 2008;325.
2. Barroso H, Meliço-Silvestre A, Taveira N. Microbiologia Médica. LIDEL, editor. Vol. 1, Microbiologia Médica. 2014. 182–196 p.
3. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Appl Microbiol Biotechnol. 2006 Dec 25;73(3):495–504.
4. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. J Biomed Biotechnol. 2009;2009:1–10.
5. Buckingham Lela. Molecular diagnostics: fundamentals, methods, and clinical applications. 2012;558.
6. Borlido L, Azevedo AM, Roque ACA, Aires-Barros MR. Magnetic separations in biotechnology. Biotechnol Adv. 2013 Dec 1;31(8):1374–85.
7. Rittich B, Španová A. SPE and purification of DNA using magnetic particles. J Sep Sci. 2013 Aug;36(15):2472–85.
8. Sabatier M, Bal A, Destras G, Regue H, Quéromès G, Cheynet V, et al. Comparison of Nucleic Acid Extraction Methods for a Viral Metagenomics Analysis of Respiratory Viruses. Microorganisms. 2020 Oct 6;8(10):1539.
9. Oliveira M, Regitano L, Roese A, Anthoniesen D, Patrocínio E, Parma M, et al. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de dna por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. 2007 [cited 2022 Jun 10]; Available from: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32770/1/LivroProtMolecular.pdf>
10. Divan Aysha, Royds Janice. Tools and techniques in biomolecular science. 2013 [cited 2022 Jun 10];512. Available from: [https://books.google.pt/books?id=ONwDmnKTnQ4C&printsec=copyright&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.pt/books?id=ONwDmnKTnQ4C&printsec=copyright&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
11. Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Mwtz H, Orth HD, Lang H. Proteinase K from Tritirachium album Limber. Eur J Biochem [Internet]. 1974 Aug 1 [cited 2022 Jun 10];47(1):91–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03671.x>
12. Liu SQ, Tao Y, Meng ZH, Fu YX, Zhang KQ. The effect of calciums on molecular motions of proteinase K. J Mol Model [Internet]. 2011 Feb 6 [cited 2022 Jun 10];17(2):289–300. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00894-010-0724-6>
13. Roche Molecular Systems. MagNA Pure 24 System Enter a new world of productivity. EUA; 2021.

14. Thermo Fisher Scientific Inc. Thermo Scientific KingFisher Flex – Brief User Manual [Internet]. 2020 [cited 2022 Oct 8]. Available from: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0019871\\_KingFisherFlex\\_English\\_Brief\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0019871_KingFisherFlex_English_Brief_UG.pdf)
15. Thermo Fisher Scientific Inc. KingFisher purification systems – Automated, scalable isolation of protein and nucleic acid. 2016.
16. Nonohay J, Hepp D. Técnicas e análises de biologia molecular. In: Porto Alegre, editor. Biotecnologia II: aplicações e tecnologias [Internet]. 1st ed. 2017 [cited 2022 Jun 21]. p. 1–31. Available from: <https://statics-submarino.b2w.io/sherlock/books/firstChapter/131481668.pdf>
17. Maurer JJ. Rapid detection and limitations of molecular techniques. Annu Rev Food Sci Technol [Internet]. 2011 [cited 2022 Jun 21];2:259–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22129383/>
18. White BA. PCR Protocols. PCR Protocols. 1993 Feb 3;15.
19. Fonseca M, Miranda S, Santos D, Gonçalves Fonseca M. Estudo comparativo das técnicas de PCR e captura híbrida para o diagnóstico do HPV: revisão de literatura.
20. Vieira A. Engenharia Genética – Princípios e Aplicações. 1st ed. LIDEL, editor. 2001.
21. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med [Internet]. 2006 Apr [cited 2022 Jun 21];27(2–3):95–125. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16460794/>
22. Chen BY, Janes HW. PCR Cloning Protocols. PCR Cloning Protocols. 2002 Apr 1;
23. Zaha A, Ferreira H, Passaglia L. Biologia molecular básica. 2000 [cited 2022 Jun 29];415. Available from: [https://books.google.com/books/about/Biologia\\_Molecular\\_B%C3%A1sica\\_4\\_ed.html?hl=pt-PT&id=EAhY0xaPa6EC](https://books.google.com/books/about/Biologia_Molecular_B%C3%A1sica_4_ed.html?hl=pt-PT&id=EAhY0xaPa6EC)
24. Verma K, Dalal J, Sharma S. Scientific Concepts Of Polymerase Chain Reaction (PCR). IJPSR. 2014 Aug 1;5(8).
25. Oliveira R, Russi J, Silva G. Fabricação de um termociclador automático. Brasil; 2017 Nov.
26. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. J Vis Exp [Internet]. 2012 Apr 20 [cited 2022 Jul 1];(62). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22546956/>
27. Oliveira T. PCR em tempo real: métodos e aplicações [Internet]. Repositório Institucional Universidade da Aveiro. 2010 [cited 2022 Jul 1]. Available from: <https://ria.ua.pt/handle/10773/7230>
28. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res [Internet]. 1996 Oct 1 [cited 2022 Jul 1];6(10):986–94. Available from: <https://genome.cshlp.org/content/6/10/986>

29. Seltsam A. Application of recombinant antigens to blood group diagnostics. *ISBT Sci Ser* [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2022 Jul 1];6(1):13–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1751-2824.2011.01428.x>
30. Gonçalves De Oliveira A, Da R, Santos S, Barcelos De Paula L, Adamski A, Reis S. A importância da tecnologia de amplificação de ácidos nucléicos para a detecção do vírus da hepatite C em bancos de sangue. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde* [Internet]. 2012 Jul 24 [cited 2022 Jul 1];10(1):313–28. Available from: <http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/525>
31. Mackay IM (Ian M. Real-time PCR in microbiology : from diagnosis to characterization. 2007;
32. Correia FL. Desenho e montagem de método rápido para diagnóstico da Borreliose de Lyme por PCR em tempo real. 2007;27.
33. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nat Biotechnol*. 1993 Sep 1;11(9):1026–30.
34. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991 Aug 15;88(16):7276–80.
35. Monteiro F, Tavares G, Ferreira M, Amorim A, Bastos P, Rocha C, et al. Technologies involved in molecular blood group genotyping. *ISBT Sci Ser* [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2022 Aug 22];6(1):1–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1751-2824.2011.01425.x>
36. Novais C, Pires-Alves M. PCR em tempo real: Uma Inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento - Edição nº33* [Internet]. 2004 Jul [cited 2022 Aug 22]; Available from: [https://www.academia.edu/7723061/0\\_Revista\\_Biotecnologia\\_Ci%C3%AAncia\\_and\\_Desenvolvimento\\_Edi%C3%A7%C3%A3o\\_no\\_33\\_julho\\_dezembro\\_2004\\_Uma\\_Inova%C3%A7%C3%A3o\\_tecnol%C3%B3gica\\_da\\_Rea%C3%A7%C3%A3o\\_em\\_Cadeia\\_da\\_Polimerase\\_PCR](https://www.academia.edu/7723061/0_Revista_Biotecnologia_Ci%C3%AAncia_and_Desenvolvimento_Edi%C3%A7%C3%A3o_no_33_julho_dezembro_2004_Uma_Inova%C3%A7%C3%A3o_tecnol%C3%B3gica_da_Rea%C3%A7%C3%A3o_em_Cadeia_da_Polimerase_PCR)
37. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. <http://dx.doi.org/10.1586/1473715952209> [Internet]. 2014 Mar [cited 2022 Jul 1];5(2):209–19. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14737159.5.2.209>
38. Bio-Rad Laboratories Inc. qPCR Amplification [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 13]. Available from: <https://www.bio-rad.com/en-pt/applications-technologies/qpcr-amplification?ID=3edb4096-4520-87be-7382-9bd9c130e419>
39. Martins C. FMUP – Quantificação de DNA por PCR em Tempo Real em diferentes Amostras Forenses [Internet]. 2017 [cited 2022 Jul 1]. Available from: [https://sigarra.up.pt/fmup/en/pub\\_geral.pub\\_view?pi\\_pub\\_base\\_id=183861](https://sigarra.up.pt/fmup/en/pub_geral.pub_view?pi_pub_base_id=183861)

40. Shatleh-Rantisi D, Tamimi A, Ashhab Y. Improving sensitivity of single tube nested PCR to detect fastidious microorganisms. *Heliyon*. 2020 Jan;6(1):e03246.
41. Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Sep 27];2019(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30710024/>
42. Husnjak K, Grce M, Magdić L, Pavelić K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods*. 2000 Aug 1;88(2):125–34.
43. Lima JF da C, Montenegro LML, Montenegro RDA, Cabral MML, Lima AS, Abath FGC, et al. Desempenho da técnica nested PCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* [Internet]. 2009 [cited 2022 Sep 29];35(7):690–7. Available from: <http://www.scielo.br/j/jbpneu/a/SkKHDFbWBVjy8BpbLZ9MCKt/?lang=pt>
44. Lagoa AM, Magalhães T, Pinheiro MF. Genetic analysis of fingerprints–Could WGA or nested-PCR be alternatives to the increase of PCR cycles number? *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2022 Sep 29];1(1):48–9. Available from: <http://www.fsigeneticssup.com/article/S1875176808002035/fulltext>
45. Ramos EM de S. Sistemas Multiplex para a detecção e caracterização molecular de infecções [Internet]. [Porto]: Universidade Fernando Pessoa; 2012 [cited 2022 Sep 30]. Available from: <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/3575>
46. Radmard S, Reid S, Ciryam P, Boubour A, Ho N, Zucker J, et al. Clinical Utilization of the FilmArray Meningitis/Encephalitis (ME) Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay. *Front Neurol* [Internet]. 2019 Mar 26 [cited 2022 Sep 29];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30972012/>
47. Hawkins SFC, Guest PC. Multiplex analyses using real-time quantitative PCR. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2017 [cited 2022 Sep 29];1546:125–33. Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6730-8\\_8](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6730-8_8)
48. Huang HS, Tsai CL, Chang J, Hsu TC, Lin S, Lee CC. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Sep 30];24(10):1055–63. Available from: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X17306493/fulltext>
49. Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl* [Internet]. 1994 [cited 2022 Sep 30];3(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8173510/>

50. Poplin V, Boulware DR, Bahr NC. Methods for rapid diagnosis of meningitis etiology in adults. *Biomark Med* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Sep 30];14(6):459–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32270693/>
51. Mostyn A, Lenihan M, O’Sullivan D, Woods S, O’Hara M, Powell J, et al. Assessment of the FilmArray® multiplex PCR system and associated meningitis/encephalitis panel in the diagnostic service of a tertiary hospital. *Infection Prevention in Practice*. 2020 Jun 1;2(2):100042.
52. Tansarli GS, Chapin KC. Diagnostic test accuracy of the BioFire® FilmArray® meningitis/encephalitis panel: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Sep 30];26(3):281–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31760115/>
53. Turchi C, Pesaresi M, Presciuttini S, Alessandrini F, Sassaroli C, Tagliabracci A. Development and forensic applications of multiplex PCR of autosomal biallele polymorphisms. 2004 [cited 2022 Sep 30]; Available from: <http://snp.cshl.org>
54. Melo EP de A. A Importância da Validação de Métodos Analíticos [Internet]. *Revista Analytica*. 2018 [cited 2022 Oct 12]. Available from: <https://revistaanalytica.com.br/a-importancia-da-validacao-de-metodos-analiticos/>
55. Taylor JK (John K. Quality assurance of chemical measurements [Internet]. Lewis Publishers; 1987 [cited 2022 Oct 12]. 328 p. Available from: [https://books.google.com/books/about/Quality\\_Assurance\\_of\\_Chemical\\_Measuremen.html?hl=pt-PT&id=7NyDzQBp-b4C](https://books.google.com/books/about/Quality_Assurance_of_Chemical_Measuremen.html?hl=pt-PT&id=7NyDzQBp-b4C)
56. Relacre. Guia 13 - Validação de métodos internos de ensaio em análise química. 2000 Feb.
57. Poutanen SM, Simor AE. Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. *CMAJ*. 2004 Jul 6;171(1):51–8.
58. Marujo V, Arvand M. The largely unnoticed spread of Clostridioides difficile PCR ribotype 027 in Germany after 2010. *Infection prevention in practice*. 2020 Dec;2(4):100102.
59. Nasiri MJ, Goudarzi M, Hajikhani B, Ghazi M, Goudarzi H, Pouriran R. Clostridioides (Clostridium) difficile infection in hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea: A systematic review and meta-analysis. *Anaerobe*. 2018 Apr;50:32–7.
60. Durai R. Epidemiology, pathogenesis, and management of Clostridium difficile infection. *Dig Dis Sci*. 2007 Nov;52(11):2958–62.
61. Farooq PD, Urrunaga NH, Tang DM, von Rosenvinge EC. Pseudomembranous colitis. *Disease-a-Month*. 2015 May 1;61(5):181–206.
62. Savolainen R, Koskinen JM, Mentula S, Koskinen JO, Kaukoranta SS. Prospective Evaluation of the mariPOC Test for Detection of Clostridioides difficile Glutamate Dehydrogenase and Toxins A/B. *J Clin Microbiol*. 2020;58(4).

63. Eckert C, Emirian A, le Monnier A, Cathala L, de Montclos H, Goret J, et al. Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. *New Microbes New Infect.* 2015 Jan;3:12–7.
64. Spigaglia P, Mastrantonio P. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9):3470–5.
65. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16020.
66. Carroll KC, Mizusawa M. Laboratory Tests for the Diagnosis of *Clostridium difficile*. *Clin Colon Rectal Surg.* 2020 Mar;33(2):73–81.
67. Fang FC, Polage CR, Wilcox MH. Point-Counterpoint: What Is the Optimal Approach for Detection of *Clostridium difficile* Infection? *J Clin Microbiol.* 2017;55(3):670–80.
68. Krutova M, Briksi A, Tkadlec J, Zajac M, Matejkova J, Nyc O, et al. Evaluation of a Gastrointestinal Pathogen Panel Immunoassay in Stool Testing of Patients with Suspected *Clostridioides (Clostridium) difficile* Infection. *J Clin Microbiol.* 2019;57(10).
69. Androga GO, McGovern AM, Elliott B, Chang BJ, Perkins TT, Foster NF, et al. Evaluation of the Cepheid Xpert *C. difficile*/Epi and meridian bioscience illumigene *C. difficile* assays for detecting *Clostridium difficile* ribotype 033 strains. *J Clin Microbiol.* 2015 Mar;53(3):973–5.
70. Kukla M, Adrych K, Dobrowolska A, Mach T, Reguła J, Rydzewska G. Guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults. *Gastroenterology Review.* 2020;15(1):1–21.
71. Crobach MJT, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Aug;22 Suppl 4:S63–81.
72. Casari E, de Luca C, Calabrò M, Scuderi C, Daleno C, Ferrario A. Reducing rates of *Clostridium difficile* infection by switching to a stand-alone NAAT with clear sampling criteria. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2018;7:40.
73. Olson DC, Scobey MW. The Challenge of *Clostridium difficile* Infection. *N C Med J.* 2016;77(3):206–10.
74. Heinlen L, Ballard JD. *Clostridium difficile* infection. *Am J Med Sci.* 2010 Sep;340(3):247–52.
75. TECHLAB®. *C. diff* quick chek complete ®. USA; 2018.
76. ArcDia International Oy Ltd. TPX technology – mariPOC [Internet]. 2020 [cited 2022 Oct 12]. Available from: <https://www.arcdia.com/company/tpx-technology/>
77. BioMaxima. *Clostridium difficile* GDH+A+B – cassettes. Lublin; 2018 Jun.



78. Larson AM, Fung AM, Fang FC. Evaluation of tcdB real-time PCR in a three-step diagnostic algorithm for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2022 Oct 12];48(1):124–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19923482/>
79. ArcDia International Oy Ltd. CDI test – mariPOC [Internet]. 2020 [cited 2022 Oct 12]. Available from: <https://www.arcdia.com/maripoc/tests/cdi-test/>
80. Barbut F, Donskey CJ. Molecular Diagnostics for *Clostridium difficile*. In: Persing DH, Tenover FC, Hayden RT, Ieven M, Miller MB, Nolte FS, et al., editors. *Molecular microbiology: diagnostic, principles and practice*. 3rd ed. Washington: American Society of Microbiology; 2016. p. 185–96.
81. Cobo F. Application of Molecular Diagnostic Techniques for Viral Testing. *Open Virol J*. 2012 Nov 30;5(1):104–14.
82. Reta DH, Tessema TS, Ashenef AS, Desta AF, Labisso WL, Gizaw ST, et al. Molecular and Immunological Diagnostic Techniques of Medical Viruses. *Int J Microbiol*. 2020 Sep 4;2020:1–19.
83. ArcDia International Oy Ltd. The true solution for rapid diagnostics of acute infections [Internet]. Finlândia; 2021 Mar [cited 2022 Oct 29]. Available from: [www.maripoc.com](http://www.maripoc.com)
84. Mackenzie K. Differences between screening and diagnostics tests and case finding. *HealthKnowledge*. 2017.
85. Origüen J, Corbella L, Orellana MÁ, Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, San Juan R, et al. Comparison of the clinical course of *Clostridium difficile* infection in glutamate dehydrogenase-positive toxin-negative patients diagnosed by PCR to those with a positive toxin test. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018 Apr;24(4):414–21.
86. Pollock NR. Ultrasensitive detection and quantification of toxins for optimized diagnosis of *clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2022 Oct 26];54(2):259–64. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.02419-15>