

## **RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH**

**REF** C0701



## 1. Zweckbestimmung

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis der *Clostridium difficile*-spezifischen Glutamatdehydrogenase in humanen Stuhlproben.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

*Clostridium difficile* ist als strikt anaerob lebendes sporenbildendes Stäbchenbakterium Bestandteil der normalen Stuhlflora des Menschen. Im Jahr 2016 wurde eine Reklassifizierung des Bakteriums als *Clostridioides difficile* vorgeschlagen. Beide Namen sind bis heute zulässig im Gebrauch.

Die Besiedlungsrate mit diesem, unter normalen Umständen eher harmlosen Erreger, ist in frühester Kindheit mit bis zu 80 % sehr hoch. Sie nimmt im Laufe des Lebens ständig ab und liegt im Erwachsenenalter bei durchschnittlich nur noch 2 - 10 %. Unter bestimmten Umständen, wie beispielsweise stationärem Krankenhausaufenthalt, kann sie jedoch leicht über 30 % steigen. Entscheidend für eine durch *Clostridium difficile* verursachte Infektion (CDI) ist die Bildung der hochmolekularen Toxine A (Enterotoxin) und B (Zytotoxin). Da nicht alle Stämme von *Clostridium difficile* Toxinbildner sind und ca. 2 - 8 % gesunder Erwachsener sowie bis zu 80 % der Kinder unter 2 Jahren mit *Clostridium difficile* besiedelt sein können, ist bei Verdacht einer *C. difficile*-assoziierten Durchfallerkrankung (CDAD) allein der Nachweis der Toxine A und B von pathognomonischer Bedeutung. Voraussetzung dafür ist jedoch eine erfolgreiche Besiedlung des Dickdarms mit zur ausreichenden Toxinbildung befähigten *C. difficile*-Bakterien. Begünstigt wird die Besiedlung durch eine Reduktion der schützenden Darmflora. Ist diese beispielsweise infolge einer Antibiose oder anderer die Darmimmunität beeinträchtigenden Faktoren zerstört, können sich insbesondere *C. difficile*-Stämme ausbreiten, die eine breite und noch zunehmende Resistenz gegen verschiedene Antibiotika aufweisen. Weitere Virulenzfaktoren wie verstärkte Toxinproduktion infolge von Regulationsdefekten einiger neu definierter Stämme haben *C. difficile* zu einem „reemerging germ“ werden lassen, dessen Pathogenität sich nicht mehr allein nur auf Personen beschränkt, die infolge einer antibiotischen Behandlung an einer *Clostridium difficile* Infektion (CDI) erkranken, sondern auch zunehmend unbehandelte und nicht hospitalisierte Personen erfasst. Die wachsende Bedeutung, insbesondere als Nosokomialkeim, hat zu neuen Therapieansätzen aber vor allem auch zu neuen Algorithmen in der Diagnostik von *C. difficile* geführt. Ziel dabei ist es in erster Linie *C. difficile* nachzuweisen, um dessen Übertragung auf hospitalisierte Patienten zu vermeiden, unabhängig davon, ob es sich um toxische oder nicht toxische Stämme von *C. difficile* handelt. Als sensitiver Screeningmarker hat sich ein unter vielen Organismen weitverbreitetes und in hoher Kopienzahl vorhandenes Enzym, die Glutamatdehydrogenase (GDH), empfohlen. Da dieses Enzym auch bei vielen Darmbakterien vorkommt, ist es entscheidend, dass die Nachweissysteme treffsicher und hochsensitiv die *C. difficile*-spezifische GDH erfassen.

Der vorliegende RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH Enzymimmunoassay, erfüllt beide Voraussetzungen in hohem Maße. Allerdings ersetzt er nicht den eine CDI beweisenden obligaten Nachweis der Toxine A und B, sondern verbessert, sequentiell vor oder parallel zum RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ELISA durchgeführt, die sichere Erfassung dieses sehr bedeutsamen Nosokomialkeims. Erst die spezifischen Krankheitssymptome und der Nachweis der Toxine A und B ermöglichen die Diagnose CDI und eine adäquate Therapieentscheidung.

### 3. Testprinzip

Im RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH Test werden monoklonale Antikörper in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte sind monoklonale Antikörper gegen die Glutamatdehydrogenase von *Clostridium difficile* gebunden.

Eine Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe sowie die Kontrollen werden zusammen mit biotinylierten anti-GDH-Antikörpern (Konjugat 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) zur Inkubation in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einem Waschschrift wird Streptavidin-Poly-Peroxidase Konjugat (Konjugat 2) dazu gegeben und erneut bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert. Bei Anwesenheit der *Clostridium difficile*-spezifischen GDH in der Probe bildet sich ein Sandwich-Komplex aus immobilisierten Antikörpern, GDH und konjugierten Antikörpern. Nicht gebundenes Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration der in der Probe vorhandenen GDH von *Clostridium difficile*.

## 4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

**Tab. 1:** Packungsinhalt

Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte, 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit spezifischen Antikörpern (Maus) gegen die <i>Clostridium difficile</i> -spezifische Glutamatdehydrogenase.
Diluent   1	100 ml	Probenverdünnungspuffer 1, Protein-gepufferte NaCl-Lösung; gebrauchsfertig; blau gefärbt
Wash buffer	100 ml	Waschpuffer, Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (10-fach konz.); enthält 0,1 % Thimerosal
Control   +	2 ml	Positivkontrolle; Inaktiviertes GDH-Protein; gebrauchsfertig
Control   -	2 ml	Negativkontrolle (Probenverdünnungspuffer); gebrauchsfertig
Conjugate   1	13 ml	Biotin-konjugierte Antikörper (Maus) gegen <i>Clostridium difficile</i> -spezifische Glutamatdehydrogenase in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; grün gefärbt
Conjugate   2	13 ml	Streptavidin-Poly-Peroxidase Konjugat in stabilisierter Proteinlösung gebrauchsfertig; orange gefärbt
Substrate	13 ml	Wasserstoffperoxid/TMB; gebrauchsfertig
Stop	12 ml	Stopp-Reagenz; 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig

Gefahrstoffangabe gemäß Kennzeichnungspflicht. Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) auf [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C vier Wochen und bei einer Lagerung von 20 - 25 °C eine Woche haltbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfalldatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Das geöffnete Kit ist bei korrekter Lagerung bei 2 - 8 °C für mindestens 6 Wochen haltbar.

Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.

Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 6.1 Benötigte Reagenzien

Folgende Reagenzien werden für die Durchführung des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH Tests benötigt:

Reagenzien
Destilliertes oder deionisiertes Wasser

### 6.2 Benötigtes Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Durchführung des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH Tests benötigt:

Zubehör
Probenröhrchen
Einwegpipetten (Art. Nr.:Z0001)
Vortex Mixer (optional, siehe 9.3.)
Mikropipette für 50 - 100 µl und 1 ml Volumina
Messzylinder (1000 ml)
Stoppuhr
Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter 620 - 650 nm)
Filterpapier (Labortücher)

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren, Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Proben persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die

Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) auf [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Die im Kit befindliche Positivkontrolle enthält rekombinant hergestelltes GDH Protein. Sie sollte, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den nationalen Sicherheitsbestimmungen behandelt werden.

Der Waschpuffer enthält als Konservierungsmittel 0,1 % Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

Stuhlproben müssen so bald als möglich nach Auftreten von Durchfallsymptomen innerhalb von 3 Tagen gewonnen werden. Das Untersuchungsmaterial ist bis zur Verarbeitung bei 2 - 8 °C zu lagern. Kann das Material nicht innerhalb von 3 Tagen im Test eingesetzt werden, wird eine Lagerung bei -20 °C oder kälter empfohlen. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden. Eine im Probenverdünnungspuffer 1:11 verdünnte Stuhlprobe ist bei 2 - 8 °C bis zu 3 Tagen haltbar (Tab. 2).

**Tab. 2: Probenlagerung**

Unverdünnte Stuhlprobe		Verdünnte Stuhlprobe
2 - 8 °C	≤ -20 °C	2 - 8 °C
≤ 3 Tage	> 3 Tage	≤ 3 Tage

Stuhlproben oder Rektalabstriche sollten nicht in Transportbehältern gesammelt werden, die Transportmedien mit Konservierungsstoffen, tierischen Seren, Metall-Ionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien enthalten, da Interferenzen mit dem RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH -Test auftreten können. Wenn rektale Abstriche eingesetzt werden sollen, ist darauf zu achten, dass genügend Stuhlmaterial (ca. 100 mg) zur Testdurchführung vorhanden ist. Bei Umgebungsuntersuchungen sollten auch Stuhlproben von klinisch unauffälligen Kontaktpersonen genommen werden, um asymptomatische Träger zu identifizieren.

## 9. Testdurchführung

### 9.1 Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte **Plate** auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch sind die Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Beutel) und die Reagenzien wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.

Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind.

Ein direkter Kontakt von Proben mit den Kitkomponenten ist zur Vermeidung von Kreuzkontamination zu vermeiden.

Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung sollte vermieden werden. Es wird empfohlen, die Mikrotiterplatte zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten abzudecken oder abzukleben.

### 9.2 Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates **Wash buffer** wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

### 9.3 Vorbereitung der Proben

In ein gekennzeichnetes Teströhrchen wird 1 ml Probenverdünnungspuffer **Diluent 1** vorgelegt. Flüssiger Stuhl wird in eine Einwegpipette (Art. Nr. Z0001) bis kurz oberhalb der zweiten Markierung aufgesaugt (ca. 100 µl) und im vorgelegten Puffer suspendiert. Bei festem Stuhl wird eine äquivalente Menge Stuhl (ca. 50 - 100 mg) mit einem Spatel oder einer Einwegimpföse entnommen und suspendiert.

Das Homogenisieren der Stuhlsuspension erfolgt entweder durch Aufsaugen und Ausstoßen mit der Einwegpipette oder alternativ durch Mischen auf einem Vortex Mixer. Nach kurzem Stehenlassen (10 min) zur Sedimentation grober Stuhlpartikel kann der auf diese Weise geklärte Überstand der Stuhlsuspension direkt im Test eingesetzt werden. Erfolgt die Testdurchführung in einem ELISA-Automaten muss dieser Überstand partikelfrei sein. In diesem Fall empfiehlt sich eine Zentrifugation bei 2500 g für 5 Minuten.

**Hinweis: Die im **Diluent 1** verdünnten Stuhlproben können auch in allen anderen RIDASCREEN® ELISAs eingesetzt werden, die ebenfalls das **Diluent 1** verwenden.**

#### 9.4 Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen erfolgt die Zugabe von 100 µl der Positivkontrolle **Control | +**, der Negativkontrolle **Control | -** oder der Stuhlprobensuspension in die Vertiefungen. Anschließend werden 100 µl des Biotin-konjugierten Antikörpers **Conjugate | 1** zugegeben und nach Durchmischung (leichtes Tippen an den Plattenrand) für 60 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

#### 9.5 Waschen

Sorgfältiges Waschen ist wichtig zur Erzielung korrekter Ergebnisse und sollte daher strikt nach Anleitung erfolgen. Das Inkubat in den Kavitäten sollte zunächst in einen Abfallbehälter entleert und gemäß den behördlichen Vorschriften entsorgt werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5-Mal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer **Wash buffer** gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

Bei der Verwendung von Waschautomaten oder ELISA-Vollautomaten ist die korrekte Einstellung des Gerätes zu beachten bzw. beim Hersteller zu erfragen. Geräte, die R-Biopharm liefert, sind bereits mit validierten Einstellungen und Arbeitsprotokollen programmiert. Um Verstopfungen von Waschnadeln zu vermeiden sollten gemäß der Probenvorbereitung (Punkt 9.3.) nur partikelfreie Stuhlsuspensionen eingesetzt werden. Bei den Waschschrritten muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden.

#### 9.6 Zweite Inkubation

100 µl des Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugates **Conjugate | 2** werden in die Kavitäten pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

#### 9.7 Waschen

Waschen gemäß Punkt 9.5.

#### 9.8 Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl Substrat **Substrate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion **bei 450 nm und 620 nm Referenzwellenlänge vermessen**.

**Hinweis: Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Substrates verursachen.**



## 9.9 Verkürztes Testprotokoll

Die unter Pkt. 9.4, 9.6 und 9.8 beschriebenen Inkubationszeiten können deutlich verkürzt werden, wenn die Platte bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 20 - 25 Hz. (DSX-, Firma Dynex) inkubiert wird. Die Inkubationszeiten ändern sich dann wie folgt:

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

Es eignen sich auch separate Mikrotiterplatten-Schüttler wie der Thermomixer von Eppendorf (Frequenzeinstellung: 850 rpm) oder auch der DTS-2 von LTF-Labortechnik (Frequenz-einstellung 800 rpm).

## 10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positiv- und Negativkontrolle mitzuführen, um Reagenzienstabilität und korrekte Testdurchführung sicherzustellen. **Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (OD) der Negativkontrolle bei 450/620 nm kleiner 0,160 und der gemessene Wert der Positivkontrolle bei 450/620 nm größer 0,8 ist.** Ist der Wert der Negativkontrolle größer 0,160 kann dies ein Zeichen für ungenügendes Waschen sein. Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten ein Hinweis auf Reagenzienverfall sein.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm Distributor.

## 11. Auswertung und Interpretation

### 11.1. Berechnung des Grenzwertes

Zur Festlegung des Grenzwertes (**Cut-off**) werden zu der gemessenen Extinktion der Negativkontrolle 0,10 Extinktionseinheiten hinzuaddiert.

Cut-off = Extinktionswert der Negativkontrolle + 0,10

## 11.2. Testergebnis

Als positiv werden solche Proben beurteilt, deren Extinktionswert mehr als 10 % über dem errechneten Grenzwert liegt.

Als grenzwertig und zu wiederholen werden solche Proben bezeichnet, deren Extinktionswert im Bereich von  $\leq 10\%$  oberhalb und unterhalb des Grenzwertes liegt. Fällt eine Wiederholungsuntersuchung mit einer **neuangesetzten** Stuhlprobe wieder in den Graubereich, so ist die Probe als **grenzwertig** zu beurteilen.

Proben, die mehr als 10 % unter dem errechneten Grenzwert liegen, sind als negativ zu bewerten.

## 12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH Test weist die *Clostridium difficile*-spezifische Glutamatdehydrogenase in Stuhlproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Extinktionswertes und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Allein der zusätzlich notwendige und durchzuführende RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ELISA in Verbindung mit den klinischen Symptomen ermöglicht mit ziemlicher Sicherheit die Diagnose einer CDI.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger oder Ursachen nicht aus.

Ein negatives Ergebnis schließt eine mögliche Infektion mit *C. difficile* nicht aus. Es kann durch intermittierende Ausscheidung des Erregers und damit verbunden zu geringer Antigenmenge in der Probe verursacht sein. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine CDI, sollte eine weitere Stuhlprobe untersucht werden.

Ein grenzwertiges Ergebnis kann durch eine inhomogene Verteilung des Antigens in der Stuhlprobe verursacht werden. Deshalb sollte in einem solchen Fall eine zweite Suspension aus der gleichen Probe untersucht werden oder eine weitere Stuhlprobe zur Untersuchung angefordert werden.

## 13. Leistungsmerkmale

### 13.1. Testqualität

In einer Validierungsstudie mit dem RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA wurden retrospektiv 92 Stuhlproben untersucht. Die Proben wurden nach dem Auftauen homogenisiert und vergleichend im RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA und einem weiteren kommerziellen ELISA untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tab. 3:** Vergleich des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA zu einem kommerziellen ELISA

		Mitbewerber-ELISA	
		+	-
RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH	+	30	7
	-	0	55

Positive Übereinstimmung: 89.6 %

Negative Übereinstimmung: 94.0 %

### 13.2 Analytische Sensitivität

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA wurde der LoB (Limit of Blank) mit 90 Messungen von negativen Stuhlproben bestimmt. Der LoD (Limit of Detection) wurde anschließend mit 72 Messungen mit rekombinantem Glutamatdehydrogenase-Protein ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tab. 4:** Ergebnisse der analytischen Sensitivität des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA

	MW [OD 450/620]	ng/ml
LoB	0,018	-
LoD	-	0,024

### 13.3. Kreuzreaktivität

Verschiedene pathogene Keime des Intestinaltraktes wurden mit dem RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA untersucht und zeigten keine Kreuzreaktivität. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit Bakteriensuspensionen, die eine Konzentration von 10<sup>6</sup> bis 10<sup>9</sup> Organismen pro ml aufwiesen. Viruskulturüberstände sowie Stuhlproben sind entsprechend deklariert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tab.5:** Kreuzreaktionen mit pathogenen Mikroorganismen

Testkeim	Herkunft	MW [OD450/620]
Adenovirus	Kulturüberstand	-0.010
Aeromonas hydrophila	Kultur	-0.010
Astrovirus	Kulturüberstand	-0.006
Bacillus cereus	Kultur	-0.012
Bacteroides fragilis	Kultur	-0.004
Campylobacter coli	Kultur	-0.008
Campylobacter jejuni	Kultur	-0.011
Candida albicans	Kultur	-0.007
Citrobacter freundii	Kultur	-0.006
Clostridium bifermentans	Kultur	-0.004
Clostridium difficile	Kultur	3.472
Clostridium novyi	Kultur	-0.007
Clostridium perfringens	Kultur	-0.007
Clostridium sordellii	Kultur	-0.009
Clostridium sporogenes	Kultur	-0.011
Cryptosporidium muris	Kultur	-0.005
Cryptosporidium parvum	Kultur	-0.010
E. coli (O157:H7)	Kultur	-0.006
E. coli (O26:H-)	Kultur	-0.006
E. coli (O6)	Kultur	-0.001
Entamoeba histolytica	Stuhl	-0.001
Enterobacter cloacae	Kultur	-0.001
Enterococcus faecalis	Kultur	-0.004
Giardia lamblia	Stuhl	0.001
Klebsiella oxytoca	Kultur	-0.005
Norovirus AG Desert Shield Virus	Capsid	-0.004
Norovirus AG Hawaii Virus	Capsid	-0.004
Norovirus AG md 14S	Capsid	-0.008
Norovirus AG Norwalk Virus	Capsid	0.000
Norovirus AG Snow Mountain Virus	Capsid	-0.001
Norovirus AG Toronto Virus	Capsid	-0.005
Proteus vulgaris	Kultur	-0.009
Pseudomonas aeruginosa	Kultur	-0.015
Rotavirus	Kulturüberstand	-0.011
Salmonella enteritidis	Kultur	-0.004

Salmonella typhimurium	Kultur	-0.005
Serratia liquefaciens	Kultur	-0.006
Shigella flexneri	Kultur	-0.005
Staphylococcus aureus	Kultur	-0.009
Staphylococcus epidermidis	Kultur	-0.012
Vibrio parahaemolyticus	Kultur	-0.009
Yersinia enterocolitica	Kultur	-0.007

#### **13.4. Präzision**

Die Reproduzierbarkeit des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA wurde mit sechs Referenzen, die den gesamten Messbereich von negativ bis hoch positiv abdecken, durchgeführt. Zur Bestimmung der Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurden 40 Replikate dieser Referenzen gemessen. Die Mittelwerte und die Variationskoeffizienten (VK) wurden für 3 Lots ermittelt. Für die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurden die Referenzen an 10 verschiedenen Arbeitstagen mit 2 Läufen am Tag in Duplikaten gemessen. Die Messungen wurden mit 3 Lots und von 4 Technikern durchgeführt. Die Inter-Lot Reproduzierbarkeit wurde über alle 3 Lots ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tab. 6:** Ergebnisse der Reproduzierbarkeit/Präzision des RIDASCREEN® Clostridium difficile GDH ELISA

Referenz	Mittelwert / VK	Intra-Assay			Inter-Assay			Inter-Lot
		Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	MW	2,333	2,192	2,438	2,504	2,411	2,376	2,430
	VK (%)	8,10 %	6,71 %	4,23 %	5,65 %	7,84 %	8,14 %	7,59 %
2	MW	1,804	1,593	1,741	1,935	1,907	1,871	1,904
	VK (%)	5,24 %	6,73 %	5,34 %	6,82 %	9,26 %	9,29 %	8,51 %
3	MW	1,477	1,312	1,436	1,531	1,561	1,481	1,525
	VK (%)	7,74 %	8,91 %	6,88 %	7,91 %	10,95 %	9,64 %	9,76 %
4	MW	1,125	0,888	0,951	1,139	1,183	1,117	1,146
	VK (%)	8,25 %	8,24 %	8,55 %	8,05 %	11,49 %	11,55 %	10,67 %
5	MW	0,697	0,590	0,714	0,729	0,776	0,708	0,738
	VK (%)	8,06 %	10,13 %	13,78 %	9,88 %	11,51 %	13,59 %	12,38 %
6	MW	-0,003	-0,003	-0,007	0,008	-0,001	-0,002	0,002
	VK (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

### 13.5 Interferierende Substanzen

Die nachfolgend aufgeführten Substanzen zeigten keinen Effekt auf die Testergebnisse, wenn sie in *C. difficile* positive und negative Stuhlproben in den angegebenen Konzentrationen eingemischt wurden:










Mucin	5,0 % w/w	Diclofenac	0,1 % v/w
Humanblut	5,0 % v/w	Cyclamat	1,3 % v/w
Bariumsulfat	18,5 % w/w	Metronidazol	3,0 % w/w
Loperamid	0,02 % w/w	Hämoglobin	5,0 % v/w
Pepto-Bismol	6,3 % v/w	Vancomycin	3,0 % w/w
Stearinsäure/ Palmitinsäure	40 % w/w (1:1)		

### 14. Versionsübersicht


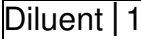
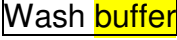
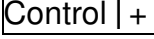
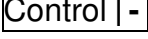
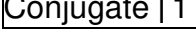
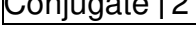
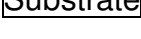

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2017-04-20	Vorversion
2020-02-18	Generelle Überarbeitung 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9.2 Herstellung des Waschpuffers 9.5 Waschen 9.8 Dritte Inkubation 10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall 11. Auswertung und Interpretation 13. Leistungsmerkmale 15. Symbolerklärung 16. Literatur

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

### Testspezifische Symbole

	Mikrotiterplatte
	Probenverdünnungspuffer 1
	Waschpuffer
	Positivkontrolle
	Negativkontrolle
	Konjugat 1
	Konjugat 2
	Substrat
	Stopp-Reagenz



## 16. Literatur

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. Cefai, C. et al.: Gastrointestinal carriage rate of Clostridium difficile in elderly, chronic care hospital patients. J. Hosp. Infect. (1988); 11: 335-339.
8. 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.
9. Voth, D.E., Ballard, J.: Clostridium difficile toxins: Mechanism of action and role in disease. J.Clin. Microbiol. (2005); 18: 247-263.
10. 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.
11. Mc.Donald, L.C. et al.: An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. N.Engl.J.Med. (2005); 353: 23.
12. 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
13. Bartlett, J.G. , Gerding, D.N.: Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. CID (2008); 46(Suppl. 1): 12-18.
14. Kufelnicka, A.M. , Kirn, T.J.: Effective utilization of evolving methods for laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection. Clin.Infect. Dis. (2011)52: 1451-1457
15. Riggs, M.S.A. et al.: Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic Clostridium difficile strains among long-term care facility residents. Clin. Infect. Dis.(2007)45:992-998
16. Lawson, P.A., et al.: Reclassification of Clostridium difficile as Clostridioides difficile (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. Anaerobe (2016)40: 95-9
17. Oren, A. , Rupnik M.: Clostridium difficile and Clostridioides difficile: Two validly published and correct names. Anaerobe (2018)52:125-126.