

# RIDA<sup>®</sup> QUICK Clostridium difficile GDH

Art. No.: N0703



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany  
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Anwendungsbereich

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDA<sup>®</sup>QUICK Clostridium difficile GDH ist ein immunchromatografischer Schnelltest zum qualitativen Nachweis der *Clostridium difficile*-spezifischen Glutamatdehydrogenase in Stuhlproben.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

*Clostridium difficile* ist als strikt anaerob lebendes sporenbildendes Stäbchenbakterium Bestandteil der normalen Stuhlflora des Menschen. 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 Toxinproteine 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 pathognomischer Bedeutung. Voraussetzung dafür ist zunächst jedoch eine erfolgreiche Besiedlung des Dickdarms mit zur ausreichenden Toxinbildung befähigten *C.difficile* Bakterien. Begünstigt wird die Besiedlung durch eine Reduktion der im Normalfall 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 die auch zunehmend unbehandelte und nicht hospitalisierte Personen erfasst. Die wachsende Bedeutung, insbesondere als Nosokomialkeim, hat zu neuen Therapieansätzen und auch vor allem zu neuen Algorithmen in der Diagnostik von *C.difficile* geführt. Ziel dabei ist es, in erster Linie *C.difficile* nachzuweisen und dessen Übertragung auf hospitalisierte Patienten zu vermeiden, und zwar unabhängig davon, ob es sich um toxische oder nicht toxische Stämme von *C.difficile* handelt. Als sensitiver Screeningmarker hat sich ein unter vielen Organismen weit verbreitetes 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 RIDA<sup>®</sup>QUICK Clostridium difficile GDH Schnelltest erfüllt beide Voraus-

setzungen 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 RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B Schnelltest 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

Der vorliegende Schnelltest ist ein einstufiger immunchromatografischer Lateral-Flow Test, bei dem sowohl biotinylierte als auch goldmarkierte Anti-GDH - Antikörper eingesetzt werden. Sobald in einer positiven Probe die Clostridium difficile GDH vorhanden ist, bilden sich Immunkomplexe mit den markierten Anti-GDH – Antikörpern aus, die dann durch die Membran laufen. Das an der Testlinie T befindliche Streptavidin bindet die heranfließenden Immunkomplexe über das an die Anti-GDH – Antikörper gekoppelte Biotin und führt so zu einer rot-violetten Färbung der T-Linie. An der nachfolgenden Kontrolllinie C werden durchlaufende nicht komplexierte goldmarkierte Antikörper gebunden. Bei negativen Proben erfolgt demnach keinerlei Bindung goldmarkierter Immunkomplexe an der T-Linie, sondern nur an der C-Linie. Die rote C-Linie zeigt stets an, ob der Testverlauf valide war.

### 4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 25 Bestimmungen

|                |         |   |
|----------------|---------|---|
| Cassette       | 25 Best | 25 einzeln verpackte Testkassetten  |
| Reagent A      | 13,5 ml | Spezifische Anti-GDH-Antikörper; enthält 0,05 % Azid, gebrauchsfertig blau gefärbt  |
| Reagent B      | 13,5 ml | Spezifische Anti-GDH-Antikörper; enthält 0,05 % Azid, gebrauchsfertig, gelb gefärbt |
| Pipet          | 25 Stck | Beutel mit 25 Einwegpipetten  |
| Reagent vial   | 25 Stck | Beutel mit 25 Reaktionsgefäßen  |
| Pipet Tip      | 25 Stck | Beutel mit 25 Pipettenspitzen   |
| Microlit Pipet | 1 Stck  | Pipette für 150 µl - Volumen  |

### 5. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Packung kann bei 2 – 25 °C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgaran-

tie mehr übernommen werden. Ebenso kann eine Verwendungsfähigkeit von Kassetten dann nicht mehr gewährleistet werden, wenn die Kassettenverpackung beschädigt ist.

## **6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör**

- Vortexmischer (optional)
- Abfallbehälter mit einer 0,5 %igen Natrium-Hypochloritlösung

## **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.

Die Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Proben Einmal-Handschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen genau wie diese mit geeigneten Desinfektionsmitteln (z.B. Natrium-Hypochlorit) behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

## **8. Sammlung und Lagerung der Proben**

Stuhlproben sind in sauberen Behältern ohne irgendwelche Zusätze zu sammeln und vor Testbeginn bei 2 – 8 °C zu lagern. Bei Lagerung von mehr als 3 Tagen muss die Probe bei - 20 °C eingefroren werden. In diesem Fall wird die Probe vor Testbeginn vollständig aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden. Wenn rektale Abstriche eingesetzt werden sollen, ist darauf zu achten, dass genügend Stuhlmaterial (ca. 50 mg) zur Testdurchführung vorhanden ist.

## **9. Testdurchführung**

### **9.1. Allgemeines**

Vor Verwendung sind die Proben, die Reagenzien sowie die Testkassetten auf Raumtemperatur (20 – 25 °C) zu bringen. Die Testkassetten sollen erst kurz vor Verwendung der Umverpackung entnommen werden. Einmal benutzte Kassetten dürfen nicht wiederverwendet werden. Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung ist zu vermeiden. Überschüssiges Reagenz darf nicht wieder in die Gefäße zurückgegeben werden, da dies zu einer Kontamination führen kann.

## 9.2. Vorbereitung der Probestestung

In ein gekennzeichnetes Reaktionsgefäß **Reagent vial** werden je **0,5 ml** (ca.12-14 Tropfen) Reagenz A **Reagent A** und Reagenz B **Reagent B** vorgelegt. Dabei ist **vorrangig** die Graduierung 0,5 ml und 1,0 ml am Reaktionsgefäß unabhängig von der jeweiligen Tropfenanzahl der Reagenzien A und B zu beachten. Die Reagenzien A und B müssen im Verhältnis 1+1 vorliegen.

### 9.2.1 Verwendung von Stuhlproben

Im Falle einer **flüssigen** Stuhlprobe werden mit der Einwegpipette **Pipet** 50 µl (bis zur zweiten Verdickung) im vorgelegten Reagenzienmix suspendiert.

Bei **fester** Stuhlprobe werden analog ca. 50 mg suspendiert. Anschließend wird das Reaktionsgefäß gut verschlossen und die Probe durch gründliches Mischen (optional durch vortexen) homogenisiert. Danach muss die homogene Suspension **5 Minuten** sedimentieren, damit sich ein weitgehend partikelfreier Überstand bildet. Zur Sedimentation kann das Reaktionsgefäß in eine der Öffnungen des Reagenzieneinsatzes eingestellt werden.

## 9.3. Proben -Testung

Die der Umverpackung entnommene Testkassette **Cassette** wird auf eine ebene Unterlage gelegt. Danach wird eine unbenutzte Pipettenspitze **Pipet Tip** auf die Microlitpipette **Microlit Pipet** gesetzt und 150 µl Überstand aus dem jeweiligen Reaktionsgefäß entnommen und in das Applikationsfeld der Testkassette pipettiert. Es ist darauf zu achten, dass die Flüssigkeit ungehindert durch die Membran läuft. Bei richtiger Durchführung erscheint die Kontrollbande an der Kontrolllinie C nach etwa 3 Minuten. Sollte die Kontrolllinie nicht nach 3 Minuten sichtbar sein, so muss eine erneut hergestellte Probe stärker sedimentiert werden (optional durch eine 2-minütige Zentrifugation bei 2000 g) und in das Applikationsfeld einer neuen Testkassette pipettiert werden.

Das Testergebnis ist immer nach **15 Minuten** abzulesen. Die Färbung der Banden und deren Intensität kann sich während der Gesamtentwicklungszeit und nach Trocknung des Streifens verändern von rot-violett nach blau- bis grau-violett.

## 10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Der Test ist nur auszuwerten, wenn die Testkassette vor dem Einpipettieren der Proben-suspension unversehrt ist und keine farbigen Veränderungen oder Banden darauf zu sehen sind. Ferner muss nach der 15-minütigen Inkubationszeit mindestens die rotviolette Kontrollbande sichtbar sein. Erscheint diese nicht, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der Testkassetten und der verwendeten Reagenzien
- Korrekte Testdurchführung
- Kontamination der Reagenzien

Ist danach bei Wiederholung des Tests mit einer neuen Testkassette die Kontrollbande wiederum nicht sichtbar, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm Distributeur.

## 11. Auswertung und Interpretation

Es dürfen maximal zwei Banden erscheinen, vom Probenapplikationsfeld aus gesehen in folgender Reihenfolge: Eine rotviolette Reaktionsbande an der Testlinie T und eine rotviolette Kontrollbande an der Kontrolllinie C. **Fehlt die Kontrollbande ist der Test nicht auswertbar und ungültig !**

Folgende Interpretationen sind möglich:

- **Clostridium difficile GDH positiv** : beide Banden sind sichtbar.
- **Clostridium difficile GDH negativ** : nur die Kontrollbande ist sichtbar.
- **Ungültig** : keine Bande ist sichtbar oder eine andere Konstellation als oben beschrieben. Ebenso sind Banden-Verfärbungen, die erst deutlich später als nach 15 Minuten auftreten, ohne diagnostischen Wert und nicht zu beurteilen.

## 12. Grenzen der Methode

Der RIDA<sup>®</sup>QUICK Clostridium difficile GDH weist spezifisch die Glutamatdehydrogenase von Clostridium difficile in Stuhlproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Intensität der sichtbaren spezifischen Bande und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. **Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.**

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

Ein **negatives** Ergebnis schließt eine mögliche Infektion mit Clostridium difficile nicht aus. Es kann durch intermittierende Ausscheidung des Erregers oder durch eine zu geringe Menge an spezifischer GDH in der Probe verursacht sein. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine Infektion mit dem gesuchten Erreger, sollte eine weitere Stuhlprobe des Patienten untersucht werden.

Ein Überschuss an Stuhlprobe kann eine bräunliche Verfärbung des Teststreifens verursachen, die die rot-violette Färbung der spezifischen Testbande überlagert. In solchen Fällen ist eine erneute Testung mit einer geringeren Stuhlmenge oder einer durch Zentrifugation stärker geklärten Stuhlsuspension erforderlich, um zu klären, ob die gesuchte Clostridium difficile-spezifische Glutamatdehydrogenase doch in der Probe vorliegt, jedoch durch zuviel eingesetzte Stuhlmatrix überlagert wurde.

### 13. Leistungsmerkmale

#### 13.1 Klinische Sensitivität und Spezifität

In einer Validierungsstudie wurden insgesamt 80 gefroren asservierte Stuhlproben im RIDA<sup>®</sup>QUICK Clostridium difficile GDH im Vergleich zur real time - PCR für die 16 S rDNA von C.difficile und zum Elisa für die C.difficile- spezifische Glutamatdehydrogenase gemessen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tab.1

Sensitivität und Spezifität des RIDA<sup>®</sup>QUICK Clostridium difficile GDH im Vergleich zu RT-PCR und Elisa

|                 |   | RIDA <sup>®</sup> QUICK Clostridium difficile GDH |    |
|-----------------|---|---|----|
|                 |   | +   | -  |
| RT- PCR / Elisa | + | 30  | 0  |
|                 | - | 1   | 49 |

relative Sensitivität : 100,0 %

relative Spezifität : 98,0 %

#### 13.2 Präzision

Zur Bestimmung der Präzision des RIDA<sup>®</sup>QUICK Clostridium difficile GDH Tests wurden die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit (10 Replikate / 1 Tag / 1 Operator / 1 Lot), die Inter-Day-Reproduzierbarkeit (3 Replikate / 10 Tage / 1 Operator / 1 Lot), die Inter-Operator-Reproduzierbarkeit (3 Replikate / 1 Tag / 3 Operatoren / 1 Lot) und die Inter-Lot-Reproduzierbarkeit (3 Replikate / 1 Tag / 1 Operator / 3 Lots) untersucht. Für jede Untersuchung wurden 5 Referenzen gemessen: eine negative, zwei schwach positive und zwei mittelstark positive. Der RIDA<sup>®</sup>QUICK Clostridium difficile GDH Test zeigte in 100% der Messungen das erwartete Ergebnis.

#### 13.3 Kreuzreaktivität

Verschiedene pathogene Keime des Intestinaltraktes wurden mit dem RIDA<sup>®</sup>QUICK Clostridium difficile GDH Test untersucht und zeigten keine Kreuzreaktivität. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit Bakteriensuspensionen ( $10^5$  bis  $10^9$  KBE/ml), mit Parasitenkulturen ( $10^7$  bis  $10^9$  Organismen/ml), mit Zellkulturüberständen virusinfizierter Zellen und einer Stuhlprobe.

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle aufgelistet:

| Testkeim                          | Herkunft            | Ergebnis       |
|-----------------------------------|---------------------|----------------|
| Adenovirus                        | Zellkulturüberstand | negativ        |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>       | Kultur              | negativ        |
| <i>Bacillus cereus</i>            | Kultur              | negativ        |
| <i>Bacteroides fragilis</i>       | Kultur              | negativ        |
| <i>Campylobacter coli</i>         | Kultur              | negativ        |
| <i>Campylobacter jejuni</i>       | Kultur              | negativ        |
| <i>Candida albicans</i>           | Kultur              | negativ        |
| <i>Citrobacter freundii</i>       | Kultur              | negativ        |
| <i>Clostridium bifermentas</i>    | Kultur              | negativ        |
| <i>Clostridium difficile</i>      | Kultur              | <b>positiv</b> |
| <i>Clostridium novyi</i>          | Kultur              | negativ        |
| <i>Clostridium perfringens</i>    | Kultur              | negativ        |
| <i>Clostridium septicum</i>       | Kultur              | negativ        |
| <i>Clostridium sordellii</i>      | Kultur              | negativ        |
| <i>Clostridium sporogenes</i>     | Kultur              | negativ        |
| <i>E. coli</i> (O26:H-)           | Kultur              | negativ        |
| <i>E. coli</i> (O6)               | Kultur              | negativ        |
| <i>E. coli</i> (O157:H7)          | Kultur              | negativ        |
| <i>Enterobacter cloacae</i>       | Kultur              | negativ        |
| <i>Enterococcus faecalis</i>      | Kultur              | negativ        |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>         | Kultur              | negativ        |
| <i>Proteus vulgaris</i>           | Kultur              | negativ        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | Kultur              | negativ        |
| Rotavirus                         | Zellkulturüberstand | negativ        |
| <i>Salmonella enteritidis</i>     | Kultur              | negativ        |
| <i>Salmonella typhimurium</i>     | Kultur              | negativ        |
| <i>Serratia liquefaciens</i>      | Kultur              | negativ        |
| <i>Shigella flexneri</i>          | Kultur              | negativ        |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | Kultur              | negativ        |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Kultur              | negativ        |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i>    | Kultur              | negativ        |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>    | Kultur              | negativ        |

#### 13.4 Interferierende Substanzen

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



Bariumsulfat (18,5 % w/w), Loperamid (Antidiarrhoikum; 0,02 % w/w), Pepto-Bismol (Antidiarrhoikum; 6,3 % v/w), Muzin (5% w/w), Cyclamat (künstlicher Süßstoff 1,3 % v/w), Humanblut (5 % v/w), Stearinsäure / Palmitinsäure (Mischung 1:1; 40 % w/w), Metronidazol (Antibiotikum; 3 % w/w), Diclofenac ( 0,1 % w/w), Vancomycin (Antibiotikum; 3 % w/w).

### 13.5 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität von RIDA<sup>®</sup>QUICK Clostridium difficile GDH wurde von 2 Operatoren in 2 Lots des Produktes durch die Testung einer Verdünnungsreihe auf ca. 4,6 ng Clostridium difficile GDH / ml Probe eingegrenzt. Die Detektionsgrenze wurde durch 60 Messungen über 5 Tage in 2 Lots von 2 Operatoren mit 4,6 ng / ml Probe mit 100% positiven Ergebnisse bestätigt.

## 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. Loeschke, K., Ruckdeschel, G.: Antibiotikaassoziierte Kolitis - aktualisiert. Internist (1989); 30: 345-353.
8. Enzensberger, R. et al.: Clostridium difficile-induzierte Enterokolitis. DMW(1986); 111: 56-59.
9. Cefai, C. et al.: Gastrointestinal carriage rate of Clostridium difficile in elderly, chronic care hospital patients. J. Hosp. Infect. (1988); 11: 335-339.
10. Samore, M.H. et al.: Wide diversity of Clostridium difficile types at a tertiary referral hospital. J. Infect. Dis. (1994); 170: 615-621.
11. Lipsett, P.A. et al.: Pseudomembranous colitis: A surgical disease? Surgery (1994); 116: 491-496.
12. Asha, N.J. et al.: Comparative analysis of prevalence, risk factors and molecular epidemiology of Antibiotic –associated diarrhea due to Clostridium difficile, Clostridium perfringens, and Staphylococcus aureus. J.Clin. Microbiol. (2006); 44: 2785-2791.
13. Voth, D.E., Ballard, J.: Clostridium difficile toxins: Mechanism of action and role in disease. J.Clin. Microbiol. (2005); 18: 247-263.
14. Borgmann, S. et al.: Increased number of Clostridium difficile infections and prevalence of Clostridium difficile PCR ribotype 001 in southern Germany. Eurosurveillance (2008); Vol 13: No.49.
15. Mc.Donald, L.C. et al.: An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. N.Engl.J.Med. (2005); 353: 23.
16. Loo, V.G. et al.: A predominantly clonal multi-institutional outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N.Engl.J.Med. (2005); 353:23
17. Bartlett, J.G. , Gerding, D.N.: Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection. CID (2008); 46(Suppl. 1): 12-18.