

RIDA[®] QUICK Clostridium difficile GDH

Réf. : N0703



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



1. Domaine d'application

Pour le diagnostic *in vitro*. RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH est un test rapide immunochromatographique pour la détection qualitative de la glutamate déshydrogénase spécifique de *Clostridium difficile* dans les échantillons de selles.

2. Résumé et explication du test

Clostridium difficile est un bacille sporulé strictement anaérobie que l'on trouve dans la flore fécale de l'homme dans des conditions normales. La prévalence de cet agent pathogène, plutôt inoffensif dans des conditions normales, est très élevée dans la petite enfance, où elle peut atteindre 80 %. Elle diminue constamment au cours de la vie et ne se situe plus, en moyenne, qu'entre 2 et 10 % à l'âge adulte. Elle peut cependant augmenter dans certaines conditions, par exemple en cas d'hospitalisation, et dépasser alors légèrement 30 %. La formation de toxines macromoléculaires A (entérotoxine) et B (cytotoxine) est décisive pour l'apparition d'une infection due à *Clostridium difficile* (CDI). Étant donné que les souches de *Clostridium difficile* ne produisent pas toutes des toxines et qu'environ 2 à 8 % des adultes sains et jusqu'à 80 % des enfants de moins de 2 ans peuvent être porteurs de *Clostridium difficile*, la détection de toxines A et B seule est un signe pathogonique lorsque l'on craint une diarrhée associée à *C. difficile* (CDAD). Cependant, il faut d'abord que les bacilles *C. difficile* capables de produire suffisamment de toxines soient bien implantés dans le gros intestin. Leur présence est favorisée par une diminution de la flore intestinale, qui assure un rôle protecteur en temps normal. Si elle est détruite, par exemple suite à une antibiose ou par d'autres facteurs qui altèrent l'immunité intestinale, des souches de *C. difficile* résistant largement ou toujours plus à divers antibiotiques peuvent alors se propager. En raison d'autres facteurs de virulence telle qu'une production accrue de toxines suite à des défauts de régulation de certaines souches redéfinies, *C. difficile* est devenu un « germe réémergent » dont le caractère pathogène ne se limite plus aux seules personnes souffrant d'une infection à *Clostridium difficile* (CDI) après un traitement antibiotique, mais concerne de plus en plus les personnes qui ne suivent pas de traitement et ne sont pas hospitalisées. L'importance croissante de ce germe, notamment en tant que germe nosocomial, a entraîné l'apparition de nouvelles approches thérapeutiques mais aussi, et surtout, de nouveaux algorithmes dans le diagnostic de *C. difficile*. L'objectif premier est alors de détecter la présence de *C. difficile* et d'éviter qu'il ne soit transmis aux patients hospitalisés, que les souches de *C. difficile* soient toxigènes ou non. La glutamate déshydrogénase (GDH), enzyme très répandue et présente en grande quantité dans de nombreux organismes, s'est avérée être un marqueur de dépistage sensible. Étant donné que l'on rencontre cette enzyme aussi chez de nombreuses bactéries intestinales, il est décisif que les dispositifs qui détectent la GDH spécifique de *C. difficile* le fassent avec précision et une grande sensibilité. Le test rapide RIDA®QUICK Clostridium difficile GDH répond parfaitement à ces deux exigences.

S'il ne remplace pas la détection de toxines A et B, indispensable pour démontrer une CDI, il améliore la détection sûre de ce germe nosocomial très significatif lorsqu'il précède ou accompagne de manière séquentielle le test rapide RIDA®QUICK Clostridium difficile Toxin A/B. Le diagnostic de CDI et le choix d'un traitement approprié ne sont possibles qu'après constatation des symptômes spécifiques de la maladie et détection des toxines A et B.

3. Principe du test

Le test rapide présenté ici est un test immunochromatographique sur membrane en une étape, qui utilise aussi bien des anticorps anti-GDH biotinylés que marqués à l'or. Dès que Clostridium difficile GDH est présent dans un échantillon positif, il se forme des immunocomplexes avec les anticorps anti-GDH marqués, qui traversent alors la membrane. La streptavidine qui se trouve sur la ligne de test T lie les immunocomplexes qui s'écoulent via la biotine couplée aux anticorps anti-GDH, entraînant une coloration violet rouge de la ligne T. Les anticorps marqués à l'or non complexés qui traversent sont liés à la ligne de contrôle C qui suit. Sur les échantillons négatifs, les immunocomplexes marqués à l'or ne sont donc pas liés à la ligne T mais uniquement à la ligne C. La ligne C rouge indique en permanence si le déroulement du test a été valide.

4. Contenu du coffret

Les réactifs contenus dans un coffret permettent de réaliser 25 tests.

Cassette	25 tests	25 cassettes de test emballées individuellement
Reagent A	13,5 ml	Anticorps spécifiques anti-GDH; contient 0,05 % d'acide, prêt à l'emploi, de couleur bleue
Reagent B	13,5 ml	Anticorps spécifiques anti-GDH; contient 0,05 % d'acide, prêt à l'emploi, de couleur jaune
Pipet	25 unités	Sachet de 25 pipettes jetables
Reagent vial	25 unités	Sachet de 25 flacons de réaction
Pipet Tip	25 unités	Sachet de 25 pointes de pipette
Microlit Pipet	1 unité	Pipette pour volume de 150 µl

5. Les réactifs et leur conservation

On peut conserver le coffret entre 2 et 25 °C ; son contenu est utilisable jusqu'à la date de péremption imprimée. Aucune garantie de qualité ne peut être assumée après

dépassement de la date de péremption. De même, le caractère utilisable des cassettes ne peut plus être garanti si leur emballage est endommagé.

6. Autres réactifs et accessoires nécessaires

- Agitateur Vortex (en option)
- Poubelle avec solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 %

7. Mesures de précaution

Uniquement pour un diagnostic *in vitro*.

Seul du personnel de laboratoire formé doit procéder à ce test. Respecter les directives de travail en laboratoire médical. Respecter à la lettre les instructions de réalisation du test. Les réactifs contiennent un conservateur, l'azoture de sodium. Éviter tout contact avec la peau et les muqueuses.

Ne pas pipetter les échantillons ni les réactifs avec la bouche. Éviter tout contact avec les blessures cutanées et les muqueuses. Porter des gants jetables pour manipuler les échantillons et se laver les mains une fois que le test est terminé. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones où l'on travaille avec des échantillons ou des réactifs de test.

Tous les réactifs et matériels qui entrent en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent, comme les échantillons eux-mêmes, être traités avec des désinfectants appropriés (p. ex. hypochlorite de sodium), ou à l'autoclave pendant une heure minimum à 121 °C.

8. Collecte et conservation des échantillons

Collecter les échantillons de selles dans des récipients propres, sans aucun adjuvant, et les conserver entre 2 et 8 °C avant de commencer le test. S'il faut conserver les échantillons plus de 3 jours, les congeler à – 20 °C. Dans ce cas, décongeler entièrement les échantillons et les porter à température ambiante avant de commencer le test. Éviter de congeler et de décongeler les échantillons plusieurs fois.

S'il faut utiliser des prélèvements rectaux, veiller à disposer d'une quantité de fèces suffisante pour effectuer le test (env. 50 mg).

9. Réalisation du test

9.1. Généralités

Avant utilisation, porter les échantillons, les réactifs ainsi que les cassettes de test à température ambiante (20–25 °C). Retirer les cassettes de test de leur emballage seulement juste avant de les utiliser. Les cassettes utilisées une fois ne sont plus réutilisables. Éviter l'ensoleillement direct pendant la réalisation du test. Ne pas verser les excédents de réactif dans les récipients car cela peut entraîner une contamination.

9.2. Préparation du test des échantillons

Dans un flacon de réaction **Reagent vial** marqué, verser goutte à goutte **0,5 ml** de réactif A **Reagent A** et de réactif B **Reagent B**. Respecter **en priorité** les graduations 0,5 ml et 1,0 ml sur le flacon de réaction, quelle que soit la quantité respective de gouttes de réactifs A et B. Le rapport entre les réactifs A et B doit être de 1+1.

9.2.1 Utilisation des échantillons de selles

Si l'échantillon de selles est **liquide**, aspirer 50 µl (jusqu'au deuxième renflement) avec la pipette jetable **Pipet** et les mettre en suspension dans le mélange de réactifs préparé.

Si l'échantillon de selles est **solide**, mettre environ 50 mg en suspension en procédant de la même manière. Ensuite, bien fermer le flacon de réaction et homogénéiser l'échantillon en le mélangeant soigneusement (avec l'agitateur Vortex le cas échéant). Ensuite, laisser sédimenter la suspension homogène pendant **5 minutes** pour qu'un surnageant presque exempt de particules se forme. Pour la sédimentation, on peut déposer le flacon de réaction dans un des trois orifices médians du support de réactifs.

9.3. Test des échantillons

Retirer la cassette de test **Cassette** de son emballage et la poser sur une surface plane. Ensuite, placer une pointe de pipette **Pipet Tip** inutilisée sur la pipette microlitre **Microlit Pipet**, prélever 150 µl de surnageant dans le flacon de réaction concerné et les déposer dans la case d'application de la cassette de test. Veiller à ce que le liquide traverse la membrane sans obstacle. Si l'opération est effectuée correctement, la bande de contrôle apparaît sur la ligne de contrôle C au bout de 3 minutes environ. Si la ligne de contrôle n'est toujours pas visible après 3 minutes, préparer un nouvel échantillon, le laisser sédimenter plus fortement (éventuellement par centrifugation à 2000 g pendant 2 minutes) et le déposer à l'aide d'une pipette dans la case d'application d'une nouvelle cassette de test.

Toujours lire le résultat du test après **15 minutes**. La coloration des bandes peut changer pendant toute la durée de développement et passer du violet rouge au violet bleu à violet gris lorsque la bandelette a séché.

10. Contrôle qualité – Signes de dégradation des réactifs

On ne peut exploiter les résultats du test que si la cassette de test est en parfait état avant de recevoir la suspension d'échantillon et si elle ne présente aucun changement de couleur ni aucune bande. En outre, on doit pouvoir voir au moins la bande de contrôle violet rouge après le temps d'incubation de 15 minutes. Si tel n'est pas le cas, vérifier les points suivants avant de refaire le test :

- durée de conservation des cassettes de test et des réactifs utilisés
- réalisation correcte du test
- contamination des réactifs

Si la bande de contrôle n'est toujours pas visible après répétition du test avec une nouvelle cassette de test, prière de contacter le fabricant ou le distributeur R-Biopharm local.

11. Exploitation et interprétation

Deux bandes au maximum doivent apparaître, dans l'ordre suivant vu depuis la case d'application de l'échantillon : une bande de réaction violet rouge sur la ligne de test T et une bande de contrôle violet rouge sur la ligne de contrôle C. **Si la bande de contrôle n'apparaît pas, le test ne peut être exploité et il n'est pas valable !**

Interprétations possibles :

- **Clostridium difficile GDH positif** : les deux bandes sont visibles.
- **Clostridium difficile GDH négatif** : seule la bande de contrôle est visible.
- **Non valable** : aucune bande n'est visible, ou l'agencement est différent de celui indiqué ci-dessus. De même, les colorations de bandes qui apparaissent seulement bien après 15 minutes n'ont aucune valeur diagnostique et sont inexploitable.

12. Limites de la méthode

Le test RIDA[®]QUICK Clostridium difficile GDH détecte spécifiquement la présence de glutamate déshydrogénase de Clostridium difficile dans les échantillons de selles. On ne peut pas en déduire une relation entre l'intensité de la bande spécifique visible et l'apparition ou la gravité des symptômes cliniques. **Toujours interpréter les résultats obtenus en corrélation avec le tableau clinique.**

Un résultat **positif** n'exclut pas la présence d'autres agents pathogènes infectieux ou sources d'infection.

Un résultat **négatif** n'exclut pas une infection éventuelle par Clostridium difficile. Il peut résulter d'une élimination intermittente de l'agent pathogène ou d'une quantité trop faible de GDH spécifique dans l'échantillon. Si l'anamnèse laisse craindre de manière justifiée une infection par l'agent pathogène recherché, analyser un autre échantillon de selles du patient.

Un échantillon de selles trop volumineux peut entraîner une coloration brunâtre de la bandelette d'essai, qui masque la coloration violet rouge de la bande de test spécifique. Dans ce cas, il faut refaire le test avec une quantité de selles moindre ou avec une suspension de selles mieux éclaircie par centrifugation, afin de déterminer si la glutamate déshydrogénase spécifique de Clostridium difficile, que l'on recherche, est effectivement présente dans l'échantillon mais a été masquée par une matrice fécale trop abondante.

13. Caractéristiques de performances

13.1 Sensibilité et spécificité cliniques

Dans le cadre d'une étude de validation, le test RIDA[®]QUICK Clostridium difficile GDH a été comparé à la PCR en temps réel pour l'ADN ribosomique 16S de C. difficile, et à Elisa pour la déshydrogénase spécifique de C. difficile, sur un total de 80 échantillons de selles conservés par congélation. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-après.

Tab. 1

Sensibilité et spécificité du test RIDA[®]QUICK Clostridium difficile GDH par rapport à la RT-PCR en temps réel et à Elisa

		RIDA [®] QUICK Clostridium difficile GDH	
		+	-
RT- PCR / Elisa	+	30	0
	-	1	49

Sensibilité relative : 100,0 %

Spécificité relative : 98,0 %

13.2 Précision

Pour déterminer la précision du test RIDA[®]QUICK Clostridium difficile GDH, on a analysé la reproductibilité intra-dosage (10 réplicats / 1 jour / 1 opérateur / 1 lot), la reproductibilité inter-jour (3 réplicats / 10 jours / 1 opérateur / 1 lot), la reproductibilité inter-opérateur (3 réplicats / 1 jour / 3 opérateurs / 1 lot) et la reproductibilité inter-lot (3 réplicats / 1 jour / 1 opérateur / 3 lots). Cinq références ont été mesurées pour chaque analyse : une négative, deux faiblement positives et deux moyennement positives. Toutes les mesures ont donné les résultats attendus pour le test RIDA[®]QUICK Clostridium difficile GDH.

13.3 Réactivité croisée

Différents germes pathogènes du tractus intestinal ont été testés avec le test RIDA[®]QUICK Clostridium difficile GDH et n'ont montré aucune réactivité croisée. Les tests ont été réalisés avec des suspensions bactériennes (10^5 à 10^9 ufc/ml), avec des cultures de parasites (10^7 à 10^9 organismes/ml), avec des surnageants de cultures de cellules infectées par un virus et avec un échantillon de selles.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-après :

Germe testé	Origine	Résultat
Adénovirus	Surnageant de culture de	négatif

	cellules	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Culture	négatif
<i>Bacillus cereus</i>	Culture	négatif
<i>Bacteroides fragilis</i>	Culture	négatif
<i>Campylobacter coli</i>	Culture	négatif
<i>Campylobacter jejuni</i>	Culture	négatif
<i>Candida albicans</i>	Culture	négatif
<i>Citrobacter freundii</i>	Culture	négatif
<i>Clostridium bifermentans</i>	Culture	négatif
<i>Clostridium difficile</i>	Culture	positif
<i>Clostridium novyi</i>	Culture	négatif
<i>Clostridium perfringens</i>	Culture	négatif
<i>Clostridium septicum</i>	Culture	négatif
<i>Clostridium sordellii</i>	Culture	négatif
<i>Clostridium sporogenes</i>	Culture	négatif
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Culture	négatif
<i>E. coli</i> (O6)	Culture	négatif
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Culture	négatif
<i>Enterobacter cloacae</i>	Culture	négatif
<i>Enterococcus faecalis</i>	Culture	négatif
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Culture	négatif
<i>Proteus vulgaris</i>	Culture	négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Culture	négatif
Rotavirus	Surnageant de culture de cellules	négatif
<i>Salmonella enteritidis</i>	Culture	négatif
<i>Salmonella typhimurium</i>	Culture	négatif
<i>Serratia liquefaciens</i>	Culture	négatif
<i>Shigella flexneri</i>	Culture	négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Culture	négatif
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Culture	négatif
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Culture	négatif
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Culture	négatif

13.4 Substances interférentes

Les substances énumérées ci-après n'ont eu aucun effet sur les résultats de test, après avoir été ajoutées aux échantillons de selles *Clostridium difficile* GDH positifs et négatifs dans les concentrations indiquées :

Sulfate de baryum (18,5 % m/m), lopéramide (antidiarrhéique, 0,02 % m/m), peptobismol (antidiarrhéique, 6,3 % v/m), mucine (5% m/m), cyclamate (édulcorant artificiel, 1,3 % v/m), sang humain (5 % v/m), acide stéarique / acide palmitique (mélange 1:1; 40 % m/m), métronidazole (antibiotique, 3 % m/m), diclofénac (0,1 % m/m), vancomycine (antibiotique, 3 % m/m).

13.5 Sensibilité analytique

Lors d'un test d'une gamme de dilution réalisé par 2 opérateurs sur 2 lots de produit, la sensibilité analytique du test RIDA[®]QUICK Clostridium difficile GDH a été limitée à environ 4,6 ng de Clostridium difficile GDH par ml d'échantillon. Soixante mesures réalisées sur 5 jours en 2 lots par 2 opérateurs ont donné 100 % de résultats positifs et permis de confirmer la limite de détection à 4,6 ng par ml d'échantillon.

Bibliographie

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.