

RIDASCREEN[®] Clostridium difficile Toxin A/B

Art. No.: C0801



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 RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis der Toxine A und B von *Clostridium difficile* in humanen Stuhlproben und aus Kulturen von zuvor aus Stuhlproben angezüchteten toxinbildenden *Clostridium difficile*-Stämmen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Durchfallerkrankungen sind relativ häufige Nebenwirkungen von Antibiotikatherapien. Besonders seit der Einführung von Clindamycin zu Beginn der 70er Jahre traten jedoch häufiger schwerere Formen der Erkrankung auf (Antibiotika-assoziierte Colitis (AAC)), die sich bis zu einem massiven Bild der Pseudomembranösen Colitis (PMC) ausprägen konnten. *Clostridium difficile* gilt als der Erreger der Pseudomembranösen Colitis (PMC) und als eine der Ursachen für die AAC und AAD. Für das Erscheinungsbild der Erkrankung ist die Produktion der Toxine A und B durch toxigene Stämme von *Clostridium difficile* von aetiologischer Bedeutung. Diese Proteine mit Molmassen von jeweils über 200 kDa sind immunologisch und funktionell unterscheidbar. Bei Toxin A handelt es sich um ein Enterotoxin, bei Toxin B um ein Cytotoxin; beide Toxine mögen *in vivo* synergistisch wirken. Da nicht alle Stämme von *Clostridium difficile* Toxinbildner sind und ca. 2-8 % gesunder Erwachsener sowie bis zu 50 % der Kinder unter 2 Jahren mit *Clostridium difficile* besiedelt sein können, erscheint der Nachweis der Toxine A und B in der diagnostischen Praxis sinnvoller als der Keimnachweis.

Der RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B ELISA ist ein Enzymimmunoassay, mit dem simultan Toxin A und Toxin B in den Stuhlproben von Patienten unter der Verwendung monoklonaler Antikörper spezifisch nachgewiesen wird. Das zuverlässige Ergebnis der Untersuchung liegt bereits nach 2 Stunden vor, so dass frühzeitig wirksame therapeutische Maßnahmen getroffen werden können.

3. Testprinzip

Im RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B-Test werden monoklonale Antikörper in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte sind monoklonale Antikörper gegen die Toxine A und B von *Clostridium difficile* gebunden.

Eine Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe sowie die Kontrollen werden zusammen mit biotinylierten Anti-Toxin A/B-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 Toxine in der Probe bildet sich ein Sandwich-Komplex aus immobilisierten Antikörpern, Toxinen 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 Toxine A und B.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen

Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte, 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die Toxine A und B von <i>Clostridium difficile</i>
Diluent 1	100 ml	Probenverdünnungspuffer, Protein-gepufferte NaCl-Lösung; gebrauchsfertig; blau gefärbt
Wash	100 ml	Waschpuffer, Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (10fach konz.); enthält 0,1%Thimerosal
Control +	2 ml	Positivkontrolle; inaktiviertes Toxin; gebrauchsfertig
Control -	2 ml	Negativkontrolle (Probenverdünnungspuffer); gebrauchsfertig
Conjugate 1	13 ml	Biotin-konjugierte Antikörper gegen <i>Clostridium difficile</i> Toxin A und B in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; blau 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

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 4 Wochen haltbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden.

Nach Erreichen des Verfalldatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. 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. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

6.2. 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)
- Abfallbehälter mit einer 0,5%igen 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.

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 Material Safety Data Sheets (MSDS) www.r-biopharm.com .

Die im Kit befindliche Positivkontrolle enthält inaktiviertes *Clostridium difficile* Toxin, das vor Inaktivierung im Zytotoxizitätstest positiv reagierte. 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 Durchfallssymptomen 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 4 °C bis zu 3 Tagen haltbar.

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 Toxin A/B -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** 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 RIDASCREEN® 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 Einweg-Impföse 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® ELISA eingesetzt werden die ebenfalls das **Diluent | 1** verwenden.

9.4. Testung der Toxine aus *Clostridium difficile*-Kulturen

Zur Untersuchung von Kolonien nach Anzucht auf festen Nährböden (CCFA oder Schädleragar) werden diese mit einer Impföse von der Agarplatte abgenommen und in 1 ml Probenverdünungspuffers **Diluent | 1** suspendiert und gut gemischt. Die Suspension ist anschließend zu zentrifugieren (5 Minuten bei 2500 G). Der klare Überstand kann direkt im Test eingesetzt werden.

Zur Untersuchung von Flüssigkulturen werden 100 µl davon in 1 ml Probenverdünungspuffer **Diluent | 1** suspendiert und gut gemischt. Die Suspension ist anschließend zu zentrifugieren (5 Minuten bei 2500 G). Der klare Überstand kann direkt im Test eingesetzt werden.

Hinweis:

Der Toxinnachweis aus Kultur gelingt nur, wenn bereits die Sporulation der Clostridienzellen eingesetzt hat. Die Sporulation und die damit verbundene Toxinausscheidung erfolgt erst in der späten stationären Wachstumsphase der Keime, wenn die Nährstoffe aufgebraucht sind.

9.5. 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 (oder gegebenenfalls des Überstandes der Kolonie-Suspension) 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.

9.6. 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 5mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer 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 (Pkt. 9.3.) nur partikelfreie Stuhlsuspension eingesetzt werden. Bei den Waschschrritten muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden.

9.7. 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.

9.8. Waschen

Waschen gemäß Pkt. 9.6.

9.9. 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 gemessen (optional: 450/620 nm). Der Abgleich des Nullwertes sollte gegen Luft -also ohne Mikrotiterplatte- erfolgen.

Hinweis:

Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Substrates verursachen.

9.9. Verkürztes Testprotokoll

Die unter Pkt. 9.5, 9.7 und 9.9 beschriebenen Inkubationszeiten können deutlich verkürzt werden, wenn die Platte bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 20-25 Hz. (DSX®, Fa. 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 der DTS-2 von LTF-Labortechnik (Frequenzeinstellung 800 rpm).

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positiv- und Negativkontrolle mitzuführen, um Reagenzien-Stabilität und korrekte Testdurchführung sicherzustellen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (O.D.) der Negativkontrolle bei 450 nm kleiner 0,2 (kleiner 0,160 bei 450/620 nm) und der gemessene Wert der Positivkontrolle bei 450 nm oder bei 450/620 nm größer 0,8 ist. Ist der Wert der Negativkontrolle größer 0,2 (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 einen 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 werden zu der gemessenen Extinktion der Negativkontrolle 0,15 Extinktionseinheiten hinzuaddiert.

$$\text{Cut-off} = \text{Extinktionswert der Negativkontrolle} + 0,15$$

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 10 % oberhalb und unterhalb des Grenzwertes liegt. Fällt eine Wiederholungsuntersuchung mit einer frischen Stuhlprobe wieder in den Graubereich, so ist die Probe als negativ 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 Toxin A/B Test weist Toxin A und B von *Clostridium difficile* in Stuhlproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Extinktionswertes 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 nicht aus.

Ein negatives Ergebnis schließt eine mögliche Infektion mit *Clostridium difficile* nicht aus.

Es kann durch proteolytischen Abbau der Toxine bei unsachgemäßer Lagerung der Probe verursacht sein. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine Infektion mit *Clostridium difficile* sollte eine weitere Stuhlprobe untersucht werden.

Ein grenzwertiges Ergebnis kann durch eine inhomogene Verteilung der Toxine 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.

Die kulturelle Anzucht von *Clostridium difficile* bei negativem Toxin-Befund der Stuhlprobe könnte ein Hinweis auf atoxigene Stämme von *Clostridium difficile* sein. Zur Abklärung eines solchen Ergebnisses sollten verdächtige Kolonien im ELISA auf Toxinbildung untersucht werden.

13. Leistungsmerkmale

13.1. Testqualität

In einer prospektiven Studie in einer großen deutschen Klinik wurden 502 Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf eine CDAD (*Clostridium difficile* assoziierte Diarrhö) mit dem RIDASCREEN® ELISA und weiteren kommerziellen ELISAS untersucht und gegen den Zytotoxizitätstest als Goldstandard verglichen. Dabei zeigte der RIDASCREEN® ELISA die beste Übereinstimmung mit dem Goldstandard. Die Ergebnisse der Studie sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Vergleich des RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B mit Goldstandard (Zytotoxizitätstest mit Neutralisation)

		RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B	
		pos	neg
Goldstandard	pos	61	7
	neg	14	420

Sensitivität:	89,7 %
Spezifität:	96,8 %
Positiver Vorhersagewert:	81,3 %
Negativer Vorhersagewert:	98,4 %

13.2. Kreuzreaktivität

Verschiedene pathogene Keime des Intestinaltraktes wurden mit dem RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ELISA untersucht und zeigten keine Kreuzreaktivität. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit Bakteriensuspensionen (10^6 bis 10^9 cfu/ml), mit Parasitenkulturen (10^7 bis 10^9 Organismen/ml) und mit Zellkulturüberständen virusinfizierter Zellen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 2 aufgelistet.

Tab.2 : Kreuzreaktionen mit pathogenen Keimen des Intestinaltraktes

Testkeim	Ergebnis [OD 450]
<i>Adenovirus</i>	0.060
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.057
Astrovirus	0.055
<i>Bacillus cereus</i>	0.053
<i>Bacteroides fragilis</i>	0.058
<i>Campylobacter coli</i>	0.061
<i>Campylobacter jejuni</i>	0.059
<i>Candida albicans</i>	0.066
<i>Citrobacter freundii</i>	0.055
<i>Cryptosporidium muris</i>	0.061
<i>Cryptosporidium parvum</i>	0.054
<i>E. coli</i> (EPEC)	0.060
<i>E. coli</i> (ETEC)	0.054
<i>E. coli</i> (STEC)	0.053
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.059
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.054
<i>Giardia lamblia</i>	0.056
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.054
<i>Proteus vulgaris</i>	0.055
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.055
Rotavirus	0.056
<i>Salmonella enteritidis</i>	0.063
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.062
<i>Serratia liquefaciens</i>	0.053
<i>Shigella flexneri</i>	0.067
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.065
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.055
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.054
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.053

3.2.1. Stammspezifität:

Die folgenden Clostridium-Stämme wurden negativ im RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B ELISA getestet : *C. bifermentans*, *C. butyricum*, nicht toxigene *C. difficile* (3 Stämme), *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. sporogenes*, *C. tetani*.

13.3. Präzision

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

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	1,181 / 5,09%	1,307 / 6,13%	1,175 / 4,28%	1,256 / 13,93%	1,218 / 12,86%	1,211 / 11,33%	1,228 / 12,78%
2	0,867 / 6,25%	0,895 / 4,59%	0,879 / 4,81%	0,947 / 15,51%	0,900 / 14,41%	0,897 / 12,47%	0,915 / 14,24%
3	0,659 / 6,01%	0,665 / 5,16%	0,616 / 7,61%	0,620 / 17,87%	0,596 / 16,85%	0,601 / 12,45%	0,605 / 15,94%
4	0,428 / 9,64%	0,461 / 4,74%	0,462 / 3,30%	0,471 / 20,13%	0,445 / 18,24%	0,482 / 18,32%	0,466 / 18,98%
5	0,320 / 8,42%	0,337 / 5,69%	0,300 / 4,71%	0,319 / 24,51%	0,293 / 19,98%	0,319 / 14,19%	0,310 / 20,14%
6	0,046 / 5,60%	0,049 / 6,91%	0,053 / 15,40%	0,058 / 24,16%	0,058 / 20,54%	0,059 / 15,37%	0,058 / 20,33%

13.4 Analytische Sensitivität

Die analytische Nachweisgrenze wurde für Clostridium difficile Toxin A und für Toxin B getrennt ermittelt. Dafür wurden LoB (Limit of Blank) mit 270 Messungen negativer Proben und LoD (Limit of Detection) für Toxin A und Toxin B mit jeweils 90 Messungen analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: LoB und LoD

	OD (450 nm)	Analytkonzentration in der Probe (ng/ml)	Analytkonzentration in Probensuspension (1+10 in Diluent) (ng/ml)
LoB	0,073	-	-
LoD (Toxin A)	0,132	1,56	0,156
LoD (Toxin B)	0,117	1,56	0,156

14. Interferierende Substanzen

Die nachfolgend aufgeführten Substanzen zeigten keinen Effekt auf die Testergebnisse, wenn sie in *C. difficile* Toxin A/B-positive und *C. difficile* Toxin A/B-negative Stuhlproben in den angegebenen Konzentrationen eingemischt wurden: Bariumsulfat (5 % w/w), Loperamid (Antidiarrhoikum; 5 % w/w), Peptobismol (Antidiarrhoikum; 5 % v/w), Muzin (5 % w/w), Cyclamat (künst-

licher Süßstoff 5 % v/w), Humanblut (5 % v/w), Stearinsäure / Palmitinsäure (Mischung 1:1, 40 % w/w), Metronidazol (0.5) (Antibiotikum 5 % v/w), Diclofenac (0.00263 % v/w).

Anhang

Testspezifische Symbole :

Plate	Mikrotiterplatte
Diluent 1	Probenverdünnungspuffer
Wash	Waschpuffer
Control +	Positivkontrolle
Control -	Negativkontrolle
Conjugate 1	Konjugat 1
Conjugate 2	Konjugat 2
Substrate	Substrat
Stop	Stopp-Reagenz

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.