





Serazym[®] Clostridium difficile GDH

Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis der *C. difficile*-spezifischen Glutamatdehydrogenase in Stuhlproben humanen Ursprungs

REF	E-107		96
REF	E-107-A2		2x96
IVD	In-vitro-Diagnostikum		



Seramun Diagnostica GmbH • Spreehagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

 UDI Eindeutige Produktidentifizierung	 IVD In-vitro Diagnostikum	 Hersteller
 Land der Herstellung und Datum der Herstellung	 Nicht wiederverwenden	 SN Seriennummer
 Begrenzung der Luftfeuchtigkeit	 Vor Sonnenlicht schützen	 REF Artikelnummer
 Gebrauchsanweisung beachten	 Verwendbar bis	 LOT Chargennummer
 Ausreichend für <i>n</i> Prüfungen	 Biologisches Risiko	 Temperaturbereich
		 Achtung

Zweckbestimmung

Serazym® Clostridium difficile GDH ist ein IVD-Test zur qualitativen Bestimmung der *Clostridioides* (früher: *Clostridium*) *difficile*-spezifischen Glutamatdehydrogenase (GDH) in Stuhlproben humanen Ursprungs durch Fachpersonal im Labor. Der Test kann angewendet werden mit den Geräten DS2® und DSX® (Dynex Technologies) sowie ThunderBolt® (Gold Standard Diagnostics) zur semi-automatischen Abarbeitung.

Er dient dem Screening und der Diagnosehilfe einer *C. difficile*-Infektion (CDI) in Proben von Patienten mit Symptomen einer *C. difficile*-assoziierten Durchfallerkrankung in Kombination mit einem anschließenden Nachweis auf das Vorhandensein der Toxine A und B bei GDH-positiven Proben zum Ausschluss toxigener Stämme (Zweistufen-Diagnostik).

Der Test darf nicht verwendet werden mit Probenmaterialien wie Biotatzen, Abstrichen, Lebensmitteln, Wasser, Mageninhalt, Kultursuspensionen und anderen Probenmaterialien als Stuhlproben humanen Ursprungs, zu Diagnose, Vorhersage, Überwachung, Prognose, als therapiebegleitendes Diagnostikum, in patientennaher Umgebung und durch Laienanwender.

Testprinzip

Serazym® Clostridium difficile GDH ist ein Enzymimmunoassay auf der Basis polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen die Glutamatdehydrogenase (GDH) von *Clostridioides difficile*. Verdünnte unbehandelte Stuhlproben sowie Negativ- und Positivkontrolle werden simultan mit Peroxidase (HRP)-markierten monoklonalen anti-*C. difficile* GDH-Antikörpern in die mit polyklonalen anti-*C. difficile* GDH-Antikörpern beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatte dosiert. Nach Inkubation werden ungebundene Komponenten durch einen Waschschrift entfernt und die HRP setzt im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung in ein blaues Reaktionsprodukt um. Diese Reaktion wird nach Inkubation durch Zugabe der Stopplösung beendet, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die bei 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration des spezifisch gebundenen GDH-Antigens direkt proportional.

Testkomponenten (Lieferumfang)

		Für 96 Kavitäten	Für 2 x 96 Kavitäten
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit polyklonalen anti- <i>C. difficile</i> GDH-Antikörpern (Schaf)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten, Farbmarkierung grün, vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF (10x)	Waschpuffer (10x) Seramun® Wash buffer A TRIS-basierter Puffer	2 x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten, Farbmarkierung grün, vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
3	DIL	Probenpuffer Seramun® Sample diluent A Phosphat-basierter Puffer	100 mL Konzentrat für 2 x 1000 mL Lösung, farblos, weiße Kappe
4	CONTROL +	Positivkontrolle Rekombinante <i>C. difficile</i> GDH	100 mL, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, schwarze Kappe
5	CONTROL -	Negativkontrolle TRIS-basierter Puffer	2,0 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt, rote Kappe
			2,0 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt, grüne Kappe

6	CONJ HRP	HRP-Konjugat HRP-markierte monoklonale anti- <i>C. difficile</i> GDH- Antikörper (Maus)	15 mL, gebrauchsfertig, grün gefärbt, braune Kappe	25 mL, gebrauchsfertig, grün gefärbt, braune Kappe
7	SUBSTR	Substrat SeramunBlau® automat fast < 0,1 % 3,3',5,5'- Tetramethyl- benzidin	15 mL, gebrauchsfertig, farblos, blaue Kappe	28 mL, gebrauchsfertig, farblos, blaue Kappe
8	STOP	Stopplösung SeramunBlau® stop 0,25 M Schwefelsäure	15 mL, gebrauchsfertig, farblos, gelbe Kappe	28 mL, gebrauchsfertig, farblos, gelbe Kappe
9	COVER	Abklebefolie	1 Stück	-
10		Analysenzertifikat	1 Stück	1 Stück
11		Gebrauchs- anleitung	1 Stück	1 Stück

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette • 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen • 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät • Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter • deionisiertes Wasser • Messzylinder • Teströhrchen für die Probenverdünnung

Wichtige Hinweise



Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* diagnostischen Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden.

Die Gebrauchsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck und seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Komponenten aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nur für die Komponenten Waschpuffer (10x), Probenpuffer, Substrat und Stopplösung erlaubt.

Der Waschpuffer (10x), der Probenpuffer, die Substrat- und die Stopplösung können darüber hinaus parameterübergreifend für die Serazym® Stuhlteste Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia (E-106) und H. pylori 2nd Gen. (E-114) eingesetzt werden.

Alle im Zusammenhang mit Serazym® Clostridium difficile GDH auftretenden schwerwiegenden Vorkommnisse sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem Anwender und/oder Patient niedergelassen sind, zu melden

Hinweise zur Testdurchführung

Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Alle Testkomponenten vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen. Positiv- und Negativkontrolle sind gebrauchsfertig.

Bei größeren Probenserien empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette, um Zeitverzögerungen zu vermeiden.

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und die Dauer der Inkubationsschritte sind einzuhalten.

Die Durchführung der Absaug- und Waschschrte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Washers oder einer Wasserstrahlpumpe erfolgen.

Beim Waschvorgang dispensierten, verdünnten Waschpuffer mindestens 5 s einwirken lassen und Waschpufferreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen! Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!


Sicherheitshinweise


Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.

Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potenziell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Zusätzliche Informationen über die Angaben in dieser Gebrauchsanleitung hinaus finden sich im Sicherheitsdatenblatt.

Das Produkt enthält folgende gefahrenbestimmende Substanz/en:

Testkomponente	Gefahrenkennzeichnung und ergänzende Angaben zu Inhaltsstoffen
WELLS	Enthält Material tierischen Ursprungs.
WASHBUF (10x)	EUH208: Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen. EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Konservierungsmittel: < 0,0015 % Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1); < 0,1 % 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan
DIL	Enthält Material tierischen Ursprungs. Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid
CONTROL +	Enthält Material mikrobiellen und tierischen Ursprungs. Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid
CONTROL -	Enthält Material tierischen Ursprungs. Konservierungsmittel: < 0,01 % Natriumazid
CONJ HRP	EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Enthält Material tierischen Ursprungs. Konservierungsmittel: < 0,01 % 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan
SUBSTR	Gefahrbestimmende Komponente: 2-Pyrrolidon Signalwort: Gefahr  H319: Verursacht schwere Augenreizung. H360: Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen. P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. P308+P313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Testkomponente	Gefahrenkennzeichnung und ergänzende Angaben zu Inhaltsstoffen
	Nur für gewerbliche Anwender. Konservierungsmittel: < 0,00015 % Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1)
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">STOP</div>	Gefahrbestimmende Komponente: Schwefelsäure 2,5 % Signalwort: Achtung  H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

Grenzen der Methode

Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von *Clostridioides difficile* GDH in Stuhlproben ist nicht gleichbedeutend mit der Diagnose einer *C. difficile*-assoziierten Erkrankung. *C. difficile*-assoziierte Erkrankungen werden durch die Toxine A und B pathogener *C. difficile*-Stämme verursacht. Bei positivem GDH-Nachweis muss daher zusätzlich auf die Toxine A und B getestet werden, um zu prüfen, ob es sich um einen toxigenen Stamm handelt. Umgekehrt schließt ein negatives Ergebnis im Serazym® *Clostridium difficile* GDH eine Infektion nicht aus. Ursachen falsch negativer Ergebnisse können einerseits durch einen ungünstigen Zeitpunkt der Probennahme und andererseits durch eine inhomogene Antigenverteilung in der Probe bedingt sein. Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von *C. difficile* GDH in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf nicht mit der OD der Positivkontrolle in Korrelation gesetzt werden. Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu falschen Ergebnissen führen. Unkorrekte Verdünnung, ungenügende Homogenisierung der Proben sowie nicht sedimentierte Festbestandteile in zentrifugierten Proben können sowohl zu falsch positiven als auch zu falsch negativen Ergebnissen führen. Die Gesamtinterpretation des Testergebnisses im ELISA sollte im Zusammenhang mit dem klinischen Bild erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein.

Behandlung der Proben

Probennahme

Stuhl in geeignetem Probenentnahmegefäß sammeln.

Probenthaltbarkeit und -lagerung

Stuhlproben sollten sofort nach Entnahme bei 2...8 °C gelagert und innerhalb von 72 h untersucht oder eingefroren bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes (> 3 x) Einfrieren und Auftauen der Proben ist wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate zu vermeiden. Stuhlproben, die bereits im Seramun® Sample diluent A entsprechend Gebrauchsanleitung verdünnt wurden, können bis zu 72 h bei 2...8 °C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

Probenvorbereitung

Unbehandelte Stuhlproben gut durchmischen und mit Probenpuffer 1 : 6 verdünnen.

In ein Reaktionsgefäß 500 µL Probenpuffer pipettieren. Bei festen oder halbfesten Stuhlproben 100 mg (Durchmesser etwa 2 - 3 mm) mit einem Einmalstäbchen, bei flüssigen Stuhlproben 100 µL in den Probenpuffer überführen und sorgfältig mischen. Gegebenenfalls Schwebeteilchen durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge 1 min bei maximaler Drehzahl sedimentieren.

Behandlung der Reagenzien

Reagenzienhaltbarkeit und -lagerung

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzienflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zum aufgedruckten Verfalldatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 2 Monate haltbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2...8 °C bis zu 1 Monat haltbar.

Reagenzienvorbereitung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminiumbeschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen. Waschpuffer (10x) 1 : 10 mit deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 mL Seramun® Wash buffer A (10x) + 90 mL deionisiertes Wasser.

Testdurchführung

1. Testreagenzien und benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. 3 Tropfen (oder 100 µL) HRP-Konjugat pro Kavität.
3. Je 100 µL Positivkontrolle
100 µL Negativkontrolle
100 µL verdünnte Stuhlprobe pipettieren.
4. Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
5. Dekantieren und 5-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
6. 3 Tropfen (oder 100 µL) Substrat pro Kavität.
7. 10 min **lichtgeschützt** bei RT inkubieren.
8. 3 Tropfen (oder 100 µL) Stopplösung pro Kavität, kurz schütteln.
9. Messen der OD bei 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min.

Auswertung der Ergebnisse

Qualitative Auswertung

Cut-off Bestimmung: OD Negativkontrolle + 0,10

Proben mit OD-Werten gleich dem oder oberhalb des errechneten Grenzwertes sind als positiv, Proben mit OD-Werten unterhalb des errechneten Grenzwertes sind als negativ zu bewerten.

Der Test kann ausgewertet werden, wenn

- OD-Mittelwert der Negativkontrolle $\leq 0,20$ (manuelle Abarbeitung)
 $\leq 0,30$ (automatische Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der Positivkontrolle $\geq 1,00$

erreicht.

Sind die genannten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Die Abarbeitung muss gemäß Gebrauchsanleitung erfolgen (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, ist der Hersteller zu kontaktieren.

Interpretation der Ergebnisse

Positiv	\geq Cut-off
Negativ	$<$ Cut-off

Aufgrund von Unterschieden in der Patientenzusammensetzung wird empfohlen, dass jedes Labor eigene Referenzbereiche bestimmen sollte.

Leistungsmerkmale

Präzision

Zur Bestimmung der Präzision wurden 4 Proben mehrfach bestimmt. Für die Bestimmung des Intra-Assay-Variationskoeffizienten wurden die Proben in einer 8-fachen Bestimmung in einem Testlauf vermessen. Die Bestimmung des Inter-Assay-Variationskoeffizienten erfolgte durch eine Doppelbestimmung in 5 verschiedenen Testläufen. Der Lot-zu-Lot-Variationskoeffizient wurde durch eine einfache Bestimmung in 3 Chargen des Produktes ermittelt.

Probe	Intra-Assay-Variationskoeffizient		Inter-Assay-Variationskoeffizient		Lot-to-Lot-Variationskoeffizient	
	\bar{x} OD	VK (%)	\bar{x} OD	VK (%)	\bar{x} OD	VK (%)
1	2,800	1,52	1,707	14,6	1,840	9,0
2	1,960	2,46	1,155	12,8	1,285	13,4
3	0,611	7,19	0,895	10,9	1,071	11,4
4	0,352	5,15	0,349	26,6	0,026	17,6

Nachweisgrenzen

Die untere Nachweisgrenze der Glutamatdehydrogenase (GDH) im Serazym® Clostridium difficile GDH wurde durch Titration von rekombinanter GDH mit 10 ng/mL bestimmt.

Sensitivität und Spezifität

Von 102 Stuhlproben, die mittels PCR als *Clostridioides difficile*-positiv bestimmt worden waren, reagierten 98 im Serazym® ELISA positiv, was einer Sensitivität von 96,1 % entspricht.

Zusätzlich wurden die Sensitivität und Spezifität des Serazym® ELISA im Rahmen zweier retrospektiver Studien anhand von 235 beziehungsweise 170 Stuhlproben im Vergleich zu zwei kommerziell erhältlichen ELISA bestimmt.

Studie 1

n = 235	ELISA 1 positiv	ELISA 1 negativ
Serazym® ELISA positiv	101	3**
Serazym® ELISA negativ	12*	119

Sensitivität: 89,4 %

Spezifität: 97,5 %

* 10 der 12 Serazym® ELISA negativ und Vergleichs-ELISA 1 positiv getesteten Proben waren in 2 weiteren kommerziellen ELISAs negativ.

Sensitivität berichtigt: 98,1 %

** Eine Probe wurde mittels PCR richtig positiv bestimmt.

Spezifität berichtigt: 98,3 %

Studie 2

n = 170	ELISA 2 positiv	ELISA 2 negativ
Serazym® ELISA positiv	69	1*
Serazym® ELISA negativ	3	97

Sensitivität: 95,8 %

Spezifität: 99,0 %

* Diese Probe wurde mittels PCR richtig-positiv bestimmt.

Spezifität berichtigt: 100 %

Kreuzreaktivität

Negative Stuhlsuspensionen wurden mit folgenden Mikroorganismen mit einer Keimzahl von $\geq 10^8$ Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro mL in Probenpuffer getestet und im Serazym® Clostridium difficile GDH als negativ bewertet (450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)
<i>Clostridium sordellii</i>	(ATCC 9714)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(ATCC 13048)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(ACC 13047)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(ATCC 29212)
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 13883)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	(ATCC 27337)
<i>Proteus vulgaris</i>	(ATCC 8427)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 10145)
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>enteritidis</i>	(ATCC 13076)
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i>	(ATCC 14028)
<i>Shigella flexneri</i>	(ATCC 12022)
<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(ATCC 17802)
<i>Vibrio cholerae</i>	Klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> Serotypen O3, O9	Klinische Isolate

Interferenz

Die nachfolgend aufgelisteten Substanzen zeigten bei Zumischung zu positiven und negativen Stuhlproben in den angegebenen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis: Bariumsulfat (5 %), Buscopan® (2 mg/mL), Cyclamat (5 %), Diclofenac (2 mg/mL), Hämoglobin human (5 mg/mL), Hylak® N (5 %), Iberogast® (5 %), Immodium® akut duo (0,2 / 12,5 mg/mL), Loperamid (0,2 mg/mL), Metronidazol (2 mg/mL), Mucin (5 mg/mL), Nexium® (2 mg/mL), Palmitinsäure (20 %), Pentofuryl® (2 mg/mL), Pepto-Bismol (1 mg/mL), Perenterol (2,5 mg/mL), Rennie® (8 mg/mL), Simage® (2 mg/mL), Stearinsäure (20 %), Vancomycinhydrochlorid (0,5 %).

Applikation

Arbeitsschritte mit Schüttler

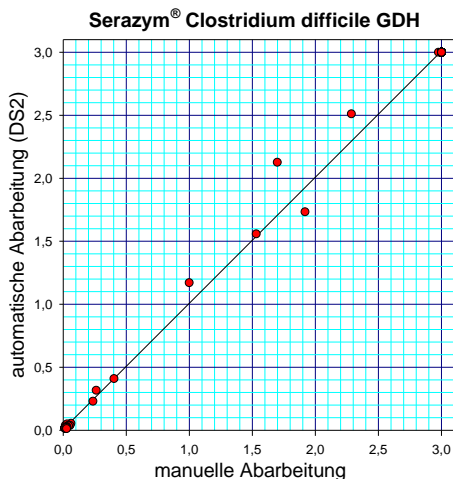
1. Testreagenzien und benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. 3 Tropfen (oder 100 μL) **CONJ HRP** HRP-Konjugat pro Kavität.
3. Je 100 μL **CONTROL +** Positivkontrolle
100 μL **CONTROL -** Negativkontrolle
100 μL verdünnte Stuhlprobe pipettieren und kurz schütteln.
4. Platte abkleben und 30 min bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 – 700 / min inkubieren.
5. Dekantieren und 5-mal mit 300 μL verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
6. 3 Tropfen (oder 100 μL) **SUBSTR** Substrat pro Kavität.
7. 10 min **lichtgeschützt** bei RT inkubieren (nicht schütteln).
8. 3 Tropfen (oder 100 μL) **STOP** Stopplösung pro Kavität, kurz schütteln.
9. Messen der OD bei 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des Serazym® Clostridium difficile GDH auf einem Mikrotiterplatten-Automaten (z.B. DS2®, DSX®, Dynex Technologies) können in Abhängigkeit vom verwendeten Gerät und von den individuellen Geräteeinstellungen im Vergleich zur manuellen Bearbeitung höhere OD-Werte gemessen werden. In diesen Fällen ist die Erhöhung des maximal zulässigen Grenzwertes der Negativkontrolle auf OD = 0,3 zulässig. Für den Waschprozess ist die Programmierung von Waschpuffer-Einwirkzeiten (mindestens 10 s pro Streifen und Waschschrift) gefolgt von einem Waschschrift mit deionisiertem Wasser und 10 s Einwirkzeit zu empfehlen. Gegebenenfalls kann die Anzahl der Waschschriffe auf 7x bis 8x erhöht werden.

Korrelation: manuelle – automatische Abarbeitung

Im Rahmen der Untersuchung von 90 Stuhlproben wurde bei parallel durchgeführter manueller und automatischer Abarbeitung (DS2®, Dynex Technologies) ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,999$ ermittelt.



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2022-07_v01_DE_EN	Gesamtes Dokument	Aktualisierung der Zweckbestimmung Umstellung der Teilabschnitte Einfügen von Sicherheitshinweisen Wegfall Pipettierschema
2023-06_v02_de_en	Gesamtes Dokument	Aktualisierung Wichtige Informationen Korrektur Testprinzip und Leistungsmerkmale; Präzision Redaktionelle Änderungen

Serazym[®] Clostridium difficile GDH

Enzyme immunoassay for the qualitative detection of *C. difficile* specific glutamate dehydrogenase in stool samples of human origin

REF	E-107	Σ	96
REF	E-107-A2	Σ	2x96
IVD	In-vitro-diagnostic medical device		CE

Seramun Diagnostica GmbH • Spreenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
 T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

IVD In-vitro diagnostic medical device	UDI Unique device identifier	Manufacturer
Country of manufacture and date of manufacture	REF Article number	SN Serial number
Keep away from sunlight	Humidity limitation	LOT Batch code
Consult instructions for use	Temperature limit	Do not reuse
Sufficient for <i>n</i> tests	Biohazard	Use-by date
		Attention

Intended Use

Serazym® *Clostridium difficile* GDH is an IVD test for the qualitative detection of *Clostridioides* (former: *Clostridium*) *difficile* specific glutamate dehydrogenase (GDH) in stool samples of human origin by a professional in a laboratory environment. The test may be used in combination with the devices DS2® and DSX® (Dynex Technologies) as well as ThunderBolt® (Gold Standard Diagnostics) for the semi-automatic processing.

It is intended to aid in the screening for and the diagnosis of a *C. difficile* infection (CDI) in samples from patients with symptoms of a *C. difficile* associated gastroenteritis in combination with the subsequent detection for the presence of toxins A and B in GDH-positive samples to exclude toxigenic strains (two-step diagnostics).

The test must not be used with specimen materials such as biopsy specimens, swabs, food, water, gastric contents, culture suspensions and materials other than stool samples of human origin, for diagnosis, prediction, monitoring, prognosis, as a companion diagnostic, in the near-patient setting and by lay persons.

Principle of the Test

Serazym® *Clostridium difficile* GDH is an enzyme immunoassay based on poly- and monoclonal antibodies against *Clostridioides difficile* glutamate dehydrogenase (GDH). Diluted, untreated stool samples as well as negative and positive controls are dispensed simultaneously with peroxidase (HRP)-labeled monoclonal anti-*C. difficile* GDH antibodies into the wells of the microtiter plate coated with polyclonal anti-*C. difficile* GDH antibodies. After incubation unbound components are removed by a washing step, then HRP converts the colorless substrate solution to a blue reaction product in the following enzymatic reaction step. The reaction is stopped by addition of the stop solution, resulting in a color change from blue to yellow. The optical density (OD) of the reaction product measured at 450 nm measuring and ≥ 620 nm reference filter, respectively, is directly proportional to the concentration of specifically bound GDH antigen.

Test Components (Delivery Scope)

			For 96 wells	For 2 x 96 wells
1	WELLS	Microtiter plate coated with polyclonal anti- <i>C. difficile</i> GDH antibodies (sheep)	12 single breakable 8-well strips, green color marking, vacuum-sealed with desiccant	2 x 12 single breakable 8-well strips, green color marking, vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF (10x)	Wash buffer (10x) Seramun® Wash buffer A TRIS-based buffer	100 mL concentrate for 1000 mL solution, colorless, white cap	2 x 100 mL concentrate for 2 x 1000 mL solution, colorless, white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent A Phosphate-based buffer	100 mL, ready to use, colored yellow black cap	2 x 100 mL, ready to use, colored yellow black cap
4	CONTROL +	Positive control Recombinant <i>C. difficile</i> GDH	2.0 mL, ready to use, colored blue, red cap	4.0 mL, ready to use, colored blue, red cap
5	CONTROL -	Negative control TRIS-based buffer	2.0 mL, ready to use, colored blue, green cap	4.0 mL, ready to use, colored blue, green cap

6	CONJ HRP	HRP conjugate HRP-labeled, monoclonal anti- <i>C. difficile</i> GDH antibodies (mouse)	15 mL, ready to use, colored green, brown cap	25 mL, ready to use, colored green, brown cap
7	SUBSTR	Substrate SeramunBlau® automat fast < 0.1 % 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine	15 mL, ready to use, colorless, blue cap	28 mL, ready to use, colorless, blue cap
8	STOP	Stop solution SeramunBlau® stop 0.25 M sulphuric acid	15 mL, ready to use, colorless, yellow cap	28 mL, ready to use, colorless, yellow cap
9	COVER	Covering film	1 pieces	-
10		Certificate of Analysis	1 piece	1 piece
11		Instructions for Use	1 piece	1 piece

Additional Materials and Aids Required for the Test Procedure

Adjustable single-channel-micropipette • 8-channel pipette or multi-pipette with pipette tips • 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microtiter plate washer • microtiter plate reader with 450 nm measuring filter and ≥ 620 nm reference filter • deionized water • measuring cylinder • tubes for sample preparation

Important Information



This device is for *in-vitro* diagnostic use only. Follow the instructions carefully. The kit may be performed by laboratory professionals only.

Do not use reagents from damaged packages or bottles. The shelf life specified must be observed. Do not mix components with reagents from other manufacturers.

Mixing of test kit components of different lots is only allowed for wash buffer (10x), sample diluent, substrate and stop solution.

Wash buffer (10x), sample diluent, substrate and stop solution are universally applicable for Serazym® stool ELISA Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia (E-106) and H. pylori 2nd Gen. (E-114).

All serious incidents occurring in relation with Serazym® Clostridium difficile GDH must be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU member state in which user and/or patient are located.

Information on Assay Procedure


All reagents should be stored at 2...8 °C. Bring all test components to room temperature before use. Positive and negative control are ready to use.


For larger sample series, pipetting reagents from liquid reservoirs using a multichannel pipette is recommended to avoid time delays. Follow the pipetting scheme and time schedules of the protocol. Wash solution should be allowed a minimum reaction time of 5 s in the wells per wash cycle. Remove wash buffer residues by thoroughly aspirating or tapping out the cavities! The aspiration and washing steps can be performed manually or with the help of a microplate washer or waterjet pump. Protect substrate from light!

Safety Instructions

Reagents must not be swallowed. Contact with skin or mucous membranes should be avoided. Handle all components and patient samples as if potentially hazardous and infectious. Additional information may be taken from the Material Safety Data Sheet.

Product contains the following hazardous component/-s:

Test component	Hazard labeling and supplementary information on ingredients
WELLS	Contains material of animal origin.
WASHBUF (10x)	EUH208: Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. EUH210: Safety data sheet available on request. Preservatives: < 0.0015 % reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1); < 0.1 % 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
DIL	Contains material of animal origin. Preservative: < 0.1 % sodium azide
CONTROL +	Contains material of microbial and animal origin. Preservative: < 0.1 % sodium azide
CONTROL -	Contains material of animal origin. Preservative: < 0.01 % sodium azide
CONJ HRP	EUH210: Safety data sheet available on request. Contains material of animal origin. Preservative: < 0.01 % 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
SUBSTR	Hazard component: 2-pyrrolidone Signal word: Danger  H319: Causes serious eye irritation. H360: May damage fertility or the unborn child. P201: Obtain special instructions before use. P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P308+P313: IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. Restricted to professional users. Preservatives: < 0.00015 % reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1)

Test component	Hazard labeling and supplementary information on ingredients
<div data-bbox="87 145 163 172" style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content;">STOP</div>	<p data-bbox="269 145 656 169">Hazard component: sulphuric acid 2.5 %</p> <p data-bbox="269 177 477 201">Signal word: Warning</p> <div data-bbox="269 209 348 284" style="text-align: center;">  </div> <p data-bbox="269 292 594 316">H290: May be corrosive to metals.</p>

Limitations of the Procedure

Qualitative enzyme immunological detection of *Clostridoides difficile* GDH in stool samples is not correlated with the diagnosis of *C. difficile*-associated disease. *C. difficile*-associated diseases are caused by toxins A and B of pathogenic *C. difficile* strains. Therefore, if testing for GDH is positive, subsequent testing for toxins A and B must be performed to determine if the strain is toxigenic. Conversely, a negative result in Serazym® *Clostridium difficile* GDH does not exclude an infection. False negative tests may result from improper timing of sample collection or inhomogeneous antigen distribution in the sample. The qualitative enzyme immunological detection of *Clostridoides difficile* GDH in stool samples does not allow correlation between the measured OD and the severity of infection. The OD of the specimen may not correlate with the OD of the positive control. Cross contamination of reagents and samples may result in false positive results. Incorrect dilutions, insufficiently homogenized samples, and particles not sedimented by centrifugation may cause false negative as well as false positive test results. The overall interpretation of the ELISA test result should consider the full clinical picture. Individual cases may require retesting at intervals of several weeks.

Sample Treatment

Sample Collection

Collect stool sample in suitable sampling container.

Sample Shelf Life and Storage

Stool samples should be stored at 2...8 °C immediately after collection and examined within 72 h or stored frozen at -20 °C. Repeated freezing (> 3 x) and thawing of samples should be avoided due to the risk of incorrect results. Stool samples that have already been diluted in Seramun® Sample diluent A according to the instructions for use can be stored at 2...8 °C for 72 h and subsequently analyzed by ELISA.

Sample Preparation

Mix untreated stool samples well and dilute 1 : 6 with sample buffer.

Pipette 500 µL sample buffer into a reaction tube. For solid or semi-solid stool samples transfer 100 mg (diameter approx. 2 - 3 mm) with a disposable stick, for liquid stool samples transfer 100 µL into the sample buffer and mix thoroughly. If necessary, sediment suspended particles by centrifugation in a microcentrifuge for 1 min at maximum speed.

Reagent Treatment

Reagent Shelf Life and Storage

The complete test kit with sealed reagent bottles and microtitration strips can be stored at 2...8 °C until the printed expiration date. All opened test kit components are stable for up to 2 months when stored properly at 2...8 °C. The diluted wash buffer can be stored at 2...8 °C for up to 1 month.

Reagent Preparation

Microtiter plate with breakable 8-well strips vacuum sealed with desiccant. Allow packaging to reach room temperature before opening. Protect unused wells from moisture and store refrigerated with desiccant in the original bag carefully resealed. Dilute wash buffer (10x) 1 : 10 with deionized water.

Example: 10 mL Seramun® Wash buffer A (10x) + 90 mL deionized water.

Assay Procedure

1. Allow test reagents and required number of wells to reach room temperature (RT). Shake reagents gently before use. Avoid foaming.
2. 3 drops (or 100 µL) **CONJ HRP** HRP conjugate per well.
3. Pipette 100 µL **CONTROL +** Positive control
100 µL **CONTROL -** Negative control
100 µL diluted stool specimen each, mix gently.
4. Cover the plate and incubate for 60 min at RT.
5. Decant, then wash each well 5x with 300 µL diluted wash buffer. Tap dry onto absorbent paper if necessary.
6. 3 drops (or 100 µL) **SUBSTR** substrate per cavity.
7. Incubate for 10 min at RT **protected from light**.
8. 3 drops (or 100 µL) **STOP** stop solution per well, mix gently.
9. Read OD at 450 nm measuring and ≥ 620 nm reference filter with a microtiter plate reader within 30 min following reaction stop.

Evaluation of Results

Qualitative Evaluation:

Cut-off determination: OD negative control + 0.10

Samples showing OD values equal with or higher than the cut-off are considered positive, samples with OD values below cut-off are considered negative.

The test run is valid if

- mean OD of the negative control is ≤ 0.20 (manual processing)
 ≤ 0.30 (automatic processing)
- mean OD of the positive control is ≥ 1.00

If the above-mentioned quality criteria are not met, test should be repeated strictly following the test procedure (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps, etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact the manufacturer.

Interpretation of Results

Positive	\geq cut-off
Negative	$<$ cut-off

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges.

Performance Characteristics

Precision

To determine precision, 4 stool samples were measured multiple times. For the determination of the intra-assay coefficient of variation samples were measured in an 8-fold determination in one test run. The determination of the inter-assay coefficient of variation was done by double determination in 5 different test runs. The lot-to-lot coefficient of variation was determined by single determination in 3 lots of the product.

Sample	Intra-assay coefficient of variation		Inter-assay coefficient of variation		Lot-to-Lot coefficient of variation	
	\bar{x} OD	CF (%)	\bar{x} OD	CF (%)	\bar{x} OD	CF (%)
1	2.800	1.52	1.707	14.6	1.840	9.0
2	1.960	2.46	1.155	12.8	1.285	13.4
3	0.611	7.19	0.895	10.9	1.071	11.4
4	0.352	5.15	0.349	26.6	0.026	17.6

Detection Limit

The lower detection limit of glutamate dehydrogenase (GDH) in Serazym® Clostridium difficile GDH was determined at 10 ng/mL by titration of recombinant GDH antigen.

Sensitivity and Specificity

Ninety eight out of 102 stool specimens characterized as *Clostridioides difficile* positive by PCR were tested positive in the Serazym® ELISA corresponding to a sensitivity of 96.1 %.

Sensitivity and specificity of the Serazym® ELISA have been determined in two retrospective studies with 235 and 170 stool specimens, respectively, in comparison to a commercially available ELISA.

Study 1

n = 235	ELISA 1 positive	ELISA 1 negative
Serazym® ELISA positive	101	3**
Serazym® ELISA negative	12*	119

Sensitivity: 89.4 %

Specificity: 97.5 %

* 10 out of 12 Serazym® ELISA negative and ELISA 1 positive samples were tested negative in 2 other commercial ELISAs. Sensitivity amended: 98.1 %

** One sample was confirmed true positive by PCR. Specificity amended: 98.3 %

Study 2

n = 170	ELISA 2 positive	ELISA 2 negative
Serazym® ELISA positive	69	1*
Serazym® ELISA negative	3	97

Sensitivity: 95.8 %

Specificity: 99.0 %

** This sample was confirmed positive by PCR. Specificity amended: 100 %

Cross Reactivity

Negative stool suspensions were spiked with the following microorganisms with a bacterial count of $\geq 10^8$ colony-forming units (CFU) per mL in sample buffer and tested negative in the Serazym® Clostridium difficile GDH (450 nm measurement and ≥ 620 nm reference filter < cut-off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 13883)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	(ATCC 27337)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)	<i>Proteus vulgaris</i>	(ATCC 8427)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 10145)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)	<i>Salmonella enterica serovar enteritidis</i>	(ATCC 13076)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)	<i>Salmonella enterica serovar typhimurium</i>	(ATCC 14028)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)	<i>Shigella flexneri</i>	(ATCC 12022)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)	<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)
<i>Clostridium sordellii</i>	(ATCC 9714)	<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(ATCC 13048)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(ATCC 13047)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(ATCC 17802)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(ATCC 29212)	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical isolate
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)	<i>Yersinia enterocolitica serotypes O3, O9</i>	Clinical isolate

Interference

None of the following substances in the indicated concentrations added to *Clostridioides difficile* GDH positive and negative stool samples did show a significant impact on the test result:

Barium sulfate (5 %), Buscopan® (2 mg/mL), Cyclamate (5 %), Diclofenac (2 mg/mL), human hemoglobin (5 mg/mL), Hylak® N (5 %), Iberogast® (5 %), Immodium® akut duo (0.2 / 12.5 mg/mL), Loperamide (0.2 mg/mL), Metronidazole (2 mg/mL), Mucin (5 mg/mL), Nexium® (2 mg/mL), palmitic acid (20 %), Pentofuryl® (2 mg/mL), Pepto-Bismol (1 mg/mL), Perenterol (2.5 mg/mL), Rennie® (8 mg/mL), Simgel® (2 mg/mL), stearic acid (20 %), Vancomycin hydrochloride (0.5 %).

Application

Working steps with shaker

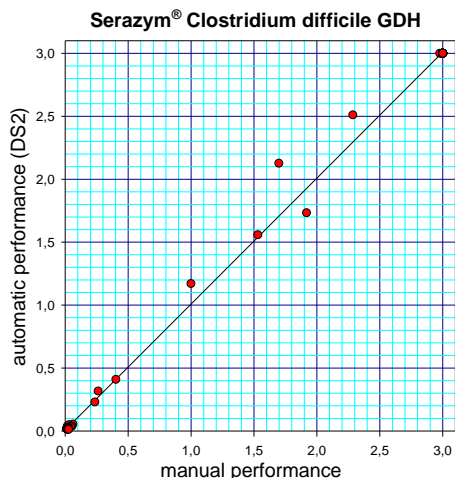
1. Allow test reagents and required number of wells to reach room temperature (RT). Shake reagents gently before use. Avoid foaming.
2. 3 drops (or 100 μL) **CONJ HRP** HRP conjugate per well.
3. Pipette 100 μL **CONTROL +** Positive control
100 μL **CONTROL -** Negative control
100 μL diluted stool specimen each, mix gently.
4. Cover the plate and incubate for 30 min at RT on an orbital shaker with a frequency of 500 – 700 rpm.
5. Decant, then wash each well 5x with 300 μL diluted wash buffer. Tap dry onto absorbent paper if necessary.
6. 3 drops (or 100 μL) **SUBSTR** substrate per cavity.
7. Incubate for 10 min at RT **protected from light**.
8. 3 drops (or 100 μL) **STOP** stop solution per well, mix gently.
9. Read OD at 450 nm measuring and ≥ 620 nm reference filter with a microtiter plate reader within 30 min following reaction stop.

Automatic Processing

Performing Serazym[®] Clostridium difficile GDH on automated microtiter plate processors (e.g. DS2[®], DSX[®]; Dynex Technologies) may cause elevated absorbance values in comparison to the manual procedure caused by differences in the wash procedures and technical specifications of the equipment. In these cases, a maximum value of OD = 0.3 is permissible for the negative control. It is recommended to program a wash protocol with 10 s soak time per strip and wash step. A final wash step with deionized water and a soak time of 10 s is recommended after each wash cycle. If necessary, the number of washing steps may be increased to 7x or 8x.

Correlation: manual – automatic processing

A panel of 90 stool specimens was processed manually and automatically in parallel (DS2[®], Dynex Technologies). The correlation coefficient was calculated at $r = 0.999$.



Change History

Version	Section	Modifications
2022-07_v01_DE_EN	Entire document	Updating of the intended use Conversion of subsections Insertion of safety instructions Removal of pipetting scheme
2023-06_v02_de_en	Entire document	Updating Important Information Updating Principle of the Test and Performance Characteristics; Precision Editorial changes

References

1. Lyerly DM, Barroso LA, Wilkins TD (1991): "Identification of the latex test-reactive protein of *Clostridium difficile* as glutamate dehydrogenase", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 29, p. 2639-2642.
2. Peterson LR and Robicsek A (2009): "Does My Patient Have *Clostridium difficile* Infection?", *Annals of Internal Medicine*, Vol. 151, No. 3, p. 176-180.
3. von Eichel-Streiber C and Braun V (2008): "Das *difficile* *Clostridium* / The *difficile* *Clostridium*", *Journal of Laboratory Medicine*, Vol. 32, No. 4, p. 219-234.
4. Wilkins TD and Lyerly DM (2003): „*Clostridium difficile* Testing: after 20 Years, Still Challenging“, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 41, No. 2, p. 531-534.
5. Zhen L, Keller SF, Lyerly DM et al. (2004): „Multicenter Evaluation of a New Screening Test that Detects *Clostridium difficile* in Faecal Specimens“, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, No. 8, p. 3837-3840.