





Serazym[®] Clostridium difficile GDH

Enzymimmunoassay zum Nachweis von *Clostridium difficile* GDH in Stuhlproben

REF E-107  96 REF E-107-A2  2x 96  *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Einführung

Der anaerobe Sporenbildner *Clostridium difficile* gilt weltweit als wichtigster Auslöser nosokomialer Diarrhoen, die sich vor allem unter Antibiotikatherapie entwickeln. Der Schweregrad der Erkrankung ist u.a. in Abhängigkeit von der Grunderkrankung des betroffenen Patienten und von der Pathogenität des verursachenden *C. difficile* Stamms unterschiedlich ausgeprägt und kann von blutig-schleimiger Diarrhoe über Colitis und Pseudomembranöse Colitis bis hin zum toxischen Megacolon führen. Für die Ausbildung von Symptomen sind die Toxine A und B ursächlich verantwortlich. Die meisten *Clostridium difficile* Stämme produzieren beide Toxine, einige aber auch nur das Toxin B. Atoxische Stämme, die nicht die Fähigkeit zur Toxinbildung haben, gelten als apathogen und sind daher diagnostisch irrelevant. Ein als „common antigen“ bezeichnetes Enzym, die Glutamatdehydrogenase (GDH), wird sowohl von toxischen als auch von atoxigenen Stämmen produziert. Da die natürliche Besiedlung des menschlichen Darms mit *Clostridium difficile* bei gesunden Erwachsenen 2 - 3% und bei Kindern bis zu 50% betragen kann, ist für die Diagnose *Clostridium difficile* assoziierter Erkrankungen allein der Toxinnachweis zur Identifikation toxischer Stämme ausschlaggebend.

Seit einigen Jahren zeichnet sich eine Veränderung der epidemiologischen Situation ab, denn es erkranken zunehmend auch jüngere und nicht hospitalisierte Patienten an einer *C. difficile* assoziierten Diarrhoe. Eine Zunahme schwerer Verläufe, verursacht durch hochvirulente Stämme, wird ebenfalls beobachtet, so dass der Nachweis eines Trägerstatus zur epidemiologischen Überwachung sinnvoll sein kann. In der Labor-Diagnostik haben sich verschiedene Vorgehensweisen etabliert. In der Regel erfolgt der Nachweis der Toxine A und B direkt aus Stuhl oder aus einer Voranreicherungskultur mittels Enzymimmunoassay. Daneben hat sich ein Zweistufen-Ablauf etabliert, der das Screening auf *C. difficile* über den Nachweis der GDH und den anschließenden Nachweis GDH positiver Proben auf Vorhandensein der Toxine A und B zum Ausschluss toxischer Stämme umfasst.

Der alleinige Nachweis von GDH ist weder zur Diagnosestellung einer *C. difficile* assoziierten Durchfallerkrankung noch für eine Therapieentscheidung ausreichend, sondern muss immer durch die Bestimmung der Toxine A und B ergänzt werden.

Literatur:

1. Wilkins TD and Lyerly DM (2003): „Clostridium difficile Testing: after 20 Years, Still Challenging“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 41, No.2, p531-534
2. Von Eichel-Streiber C und Braun V (2008): “Das difficile Clostridium” Journal Of Laboratory Medicine, Vol. 32, No. 4, p219-234
3. 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, p2639-2642.
4. 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, p3837-3840.
5. Peterson LR and Robicsek A (2009): “Does My Patient Have Clostridium difficile Infection?” Annals of Internal Medicine, Vol. 151, No. 3, p176-180.

Anwendungsbereich

Serazym® Clostridium difficile GDH ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum direkten Nachweis der Glutamatdehydrogenase (GDH) von *Clostridium difficile* in Stuhlproben.

Testprinzip

Serazym® Clostridium difficile GDH ist ein Ein-Schritt Enzymimmunoassay auf der Basis poly- und monoklonaler Antikörper gegen die Glutamatdehydrogenase (GDH) von *Clostridium difficile*. Verdünnte unbehandelte Stuhlproben und Peroxidase-(POD)-markierte monoklonale anti-GDH-Antikörper werden simultan in die mit polyklonalen anti-GDH-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) werden die ungebundenen Komponenten durch einen Waschschrift entfernt. Alternativ kann die erste Inkubation unter Schütteln auf 30 min verkürzt werden. Im anschließenden 10 minütigen Substratreaktionsschritt erfolgt der Nachweis Festphase-gebundener Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe durch Umsetzung der farblosen Substratlösung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Endprodukt. Diese Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die optische Dichte (OD) des Endprodukts bei 450 / ≥ 620 nm ist zur Konzentration des spezifisch gebundenen GDH-Antigens direkt proportional.

Testkomponenten

			Für 96 Kavitäten	Für 2x 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	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung grün vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF CONC 10x	Waschpuffer 10-fach	100 ml Konzentrat für 1000 ml Lösung weiße Kappe	2x 100 ml Konzentrat für 2x 1000 ml Lösung weiße Kappe
3	DIL	Verdünnungsmedium	100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe	2x 100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe
4	CONTROL +	Positive Kontrolle Rekombinante <i>C. difficile</i> GDH	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe	4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL -	Negative Kontrolle <i>C. difficile</i> GDH negative Probe	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe	4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6	CONJ HRP	POD-Konjugat POD-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 TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe	28 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe
8	STOP	Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure	15 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe	28 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Gewinnung und Lagerung

Stuhlproben sollten sofort nach der Entnahme bei 2...8°C gelagert und innerhalb von 72 h untersucht oder bei mindestens -20°C gelagert werden. Wiederholtes (> 3x) Einfrieren und Auftauen der Proben ist wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate zu vermeiden. Stuhlproben, die bereits im *Serazym*[®] Verdünnungsmedium entsprechend Testanleitung verdünnt wurden, können bis zu 72 Stunden bei 2...8 °C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

Vorbereitung und Verwendung

Stuhlproben gut durchmischen. In ein Reaktionsgefäß 1000 µl Verdünnungsmedium pipettieren. Bei festen oder halbfesten Stuhlproben 200 mg (Durchmesser etwa 4 - 6 mm) mit einem Einmalstäbchen, bei flüssigen Stuhlproben 200 µl in das Probenverdünnungsmedium überführen und sorgfältig mischen. Gegebenenfalls Schwebeteilchen durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge 1 min bei maximaler Drehzahl sedimentieren.

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 · destilliertes oder deionisiertes Wasser · Messzylinder · Teströhrchen (2 ml) für die Probenverdünnung · Horizontalschüttler bei Abarbeitung nach Variante 2

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 1x 96 oder 2x 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8°C mindestens 2 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei 2...8°C mindestens 1 Monat verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminium-beschichteten 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. Waschpufferkonzentrat (10-fach) 1 + 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 ml Waschpufferkonzentrat (2) + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser.

Testdurchführung

Der *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH kann in zwei Varianten abgearbeitet werden:

1. Variante: Inkubation ohne Schütteln; Gesamtinkubationsdauer 1 h 10 min
2. Variante: Inkubation mit Schütteln; Gesamtinkubationsdauer 40 min

Proben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 6 verdünnen, z.B. 200 mg oder 200 µl Stuhlprobe in 1,0 ml Verdünnungsmedium (3) gründlich resuspendieren.

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Beim Waschvorgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen! Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Arbeitsschritte Variante 1 (ohne Schütteln)

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. 3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** POD-Konjugat (6) pro Kavität.
3. Je 100 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
100 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
100 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren und kurz schütteln.
4. Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
5. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
6. 3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
7. 10 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
8. 3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
9. Messen der OD bei 450 nm / ≥620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

Arbeitsschritte Variante 2 (mit Schütteln)

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. 3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** POD-Konjugat (6) pro Kavität.
3. Je 100 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
100 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
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 Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
6. 3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
7. 10 min lichtgeschützt bei RT inkubieren (nicht schütteln).
8. 3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
9. Messen der OD bei 450 nm / ≥ 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

Berechnung der Ergebnisse

Qualitative Evaluierung

Cut-off Bestimmung: OD Negative Kontrolle + 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 im *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH zu bewerten.

Referenzwerte

<i>Serazym</i> [®] Clostridium difficile GDH	
Positiv	\geq Cut-off
Negativ	$<$ Cut-off

Aufgrund von Unterschieden im Einsender-Klientel wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche bestimmen sollte. Die genannten Werte sind deshalb nur als Empfehlung zu werten.

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- OD-Mittelwert der negativen Kontrolle $\leq 0,20$ (manuelle Abarbeitung)
 $\leq 0,30$ (automatische Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der positiven Kontrolle $\geq 1,00$

Sind die o. g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Grenzen der Methode

Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von *Clostridium 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 toxischen Stamm handelt. Umgekehrt schließt ein negatives Testergebnis im GDH ELISA eine *C. difficile* Infektion nicht zwingend aus. Nach Herstellung der Probenverdünnung im Probenverdünnungspuffer sollte die Probe möglichst zügig (innerhalb von 72 Stunden) im ELISA getestet werden, da ein lagerungsbedingter Antigenabbau zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Mehrmaliges (> 3x) Einfrieren und Auftauen der Proben kann ebenfalls zum Antigenabbau und dadurch zu einem falsch negativen Ergebnis führen. Bedingt durch die z.T. inhomogene Antigenverteilung in Stuhlproben kann bei ungenügender Homogenisierung der Proben ein falsch negatives Ergebnis resultieren. Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu falschen Ergebnissen führen. Unkorrekte Verdünnung der Proben sowie nicht sedimentierte Festbestandteile in zentrifugierten Proben können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen. Die Gesamtinterpretation des ELISA-Testergebnisses sollte im Zusammenhang mit der Klinik erfolgen.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Serazym*[®] *Clostridium difficile* GDH auf einem Mikrotitrationsplatten-Vollautomaten (wie z.B. DS2, DSX) 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 max. zulässigen Grenzwertes für die OD der Negativ-Kontrolle auf 0,3 zulässig. Für den Waschprozess ist die Einprogrammierung von Waschpuffer-Einwirkzeiten (mind. 10 sec pro Streifen und Waschschrift) gefolgt von einem Waschschrift mit destilliertem oder demineralisiertem Wasser und 10 sec Einwirkzeit zu empfehlen. Gegebenenfalls kann die Anzahl der Waschschriffe von 5x auf 7x bis 8x erhöht werden.

Korrelation: manuelle – automatische Abarbeitung

Ein Probenkollektiv von 90 Stuhlproben (45 positive und 45 negative Proben) wurde parallel von Hand und automatisch (DS2, Dynex Technologies) abgearbeitet. Die Korrelation der OD-Werte beider Bearbeitungsvarianten betrug $r = 0,999$.

Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizient (VK)
aus 8-fach Bestimmungen von
Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
1	2,800	0,040	1,52
2	1,960	0,045	2,46
3	0,611	0,041	7,19
4	0,352	0,017	5,15

Inter-Assay Variationskoeffizient (VK)
in 5 unterschiedlichen Ansätzen aus
Doppelbestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
1	1,707	0,250	14,6
2	1,155	0,148	12,8
3	0,895	0,098	10,9
4	0,381	0,068	17,9

Lot-zu-Lot-Reproduzierbarkeit
in drei verschiedenen Produktions-
chargen aus jeweils 8-fach
Bestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
1	1,840	0,166	9,0
2	1,285	0,172	13,4
3	0,349	0,093	26,6
4	0,026	0,005	17,6

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze von Glutamatdehydrogenase (GDH)-Antigen im *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH wurde durch Titration von rekombinanter GDH mit 10 ng/ml bestimmt.

Spezifität und Sensitivität

Sensitivität im Vergleich zur PCR

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

Relative Sensitivität und Spezifität

Im Rahmen von 2 Vergleichsstudien wurden insgesamt 235 bzw. 170 Stuhlproben parallel im *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH und 2 weiteren kommerziell erhältlichen ELISAs untersucht.

Studie 1

n = 235	Vergleichs ELISA 1 positiv	Vergleichs ELISA 1 negativ
<i>Serazym</i> [®] ELISA positiv	101	3**
<i>Serazym</i> [®] 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	Vergleichs ELISA 2 positiv	Vergleichs ELISA 2 negativ
<i>Serazym</i> [®] ELISA positiv	69	1*
<i>Serazym</i> [®] ELISA negativ	3	97

Sensitivität: 95,8% · Spezifität: 98,9%

* 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 pro ml aufgestockt und im *Serazym*[®] ELISA negativ getestet (OD 450 / 620 nm < 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>	(ATCC 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> Serotyp <i>O3, O9</i>	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 (5 mg/ml), Hylak® N (5%), Immodium® akut duo (0,2/12,5 mg/ml), Iberogast® (5%), 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), Simigel® (2 mg/ml), Stearinsäure (20%), Vancomycinhydrochlorid (0,5%).

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Mikrotiterplatten und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer, TMB/Substratlösung und Stopplösung.**

Das Verdünnungsmedium, der Waschpuffer, die TMB/Substratlösung und Stopplösung kann darüber hinaus Parameter-übergreifend für die *Serazytt*® Stuhiteste 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), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) und Giardia (E-106) eingesetzt werden.

Die Kompletierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8°C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

Nicht essen, trinken oder rauchen!

Nie mit dem Mund pipettieren!

Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!





Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2021-02-02	Vorbereitung und Lagerung der Proben, Testdurchführung	Aktualisierung

Inkubationsschema *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH (E-107)

1.  3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** (6)
 +
 100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren, kurz schütteln
 60 min Inkubation (Raumtemperatur)
alternativ: 30 min unter Schütteln
 5x Waschen mit Waschlösung
2.  3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min Inkubation (Raumtemperatur), lichtgeschützt
3.  3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** (8)

Messung der OD bei 450 / \geq 620 nm



Hersteller



Herstellungsdatum



Verwendbar bis

LOT

Charge

REF

Artikelnummer



Vor Sonnenlicht schützen



Temperaturbegrenzung



Biologische Risiken



Nicht wiederverwendbar



Gebrauchsanweisung beachten



Achtung



IVD In-vitro- Diagnostikum



Ausreichend für <n> Prüfungen

Serazym[®] Clostridium difficile GDH

Enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* GDH in faecal specimens

REF E-107 ▽ 96 REF E-107-A2 ▽ 2x 96 IVD *In-vitro*-diagnostic medical device CE



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Introduction

The spore forming anaerobic bacterium *Clostridium difficile* is the most common cause of nosocomial diarrhea predominantly developing in the course of antibiotic therapy. The severity of the disease in dependence of the health status of the patient but also of the pathogenicity of the *C. difficile* strain may range from bloody diarrhea to Colitis and pseudomembranous Colitis up to toxic megacolon. The two exotoxins A and B are responsible for the development of the symptoms. Most *Clostridium difficile* strains produce both, toxin A and B, but some are characterized by isolated toxin B production. Atoxigenic strains are generally considered as nonpathogenic and therefore diagnostically irrelevant. The *Clostridium difficile* specific enzyme Glutamatdehydrogenase, also described as “common antigen” is produced by both: toxigenic and atoxigenic strains.

The human intestine is colonized with *Clostridium difficile* in 2 - 3% of healthy adults and in up to 50% of children < 2 years of age. Therefore, the diagnosis of a *Clostridium difficile* associated diarrhea (CDAD) has to be confirmed by the detection of the toxins A and B.

Changes in the epidemiological situation are observed since several years: Increasingly also young adults and not hospitalized patients get sick developing the symptoms of CDAD. An increasing number of severe developments of the disease caused by highly virulent strains also occur. In this context testing of patient's status as carrier seems reasonable.

Different approaches have developed in laboratory diagnosis of *C. difficile* infections. Usually direct toxin A and B detection from stool or enrichment cultures is performed by enzyme immunoassay. In addition, a new two-step procedure has been established in several laboratories that comprise a first screening of *C. difficile* GDH and the subsequent testing for toxins A and B of GDH positive samples. The isolated detection of GDH is neither sufficient for diagnosing a CDAD nor suitable for a therapeutic decision, but always needs to be completed by the testing for toxins A and B.

References:

1. Wilkins TD and Lyerly DM (2003): „Clostridium difficile Testing: after 20 Years, Still Challenging“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 41, No.2, p531-534
2. Von Eichel-Streiber C und Braun V (2008): “Das difficile Clostridium” Journal Of Laboratory Medicine, Vol. 32, No. 4, p219-234
3. 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, p2639-2642.
4. 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, p3837-3840.
5. Peterson LR and Robicsek A (2009): “Does My Patient Have Clostridium difficile Infection?” Annals of Internal Medicine, Vol. 151, No. 3, p176-180.

Intended Use

Serazym® Clostridium difficile GDH is an *in-vitro* diagnostic medical device for direct detection of Glutamatdehydrogenase (GDH) of *Clostridium difficile* in faecal specimens.

Principle of the Test

Serazym® Clostridium difficile GDH is a one-step enzyme immunoassay on the basis of polyclonal and monoclonal antibodies to Glutamatdehydrogenase (GDH) of *Clostridium difficile*. Diluted stool specimens and monoclonal anti-GDH antibodies are dispensed simultaneously into the wells of a microtitration plate coated with polyclonal anti-GDH antibodies. After an incubation time of 60 min at room temperature (RT) unbound components are removed by a washing step. Alternatively, the first incubation can be shortened to 30 min by shaking. HRP converts the subsequently added colourless substrate solution of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) within a 10 min reaction time into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells turning the solution from blue to yellow. The optical density (OD) of the solution read at 450 / \geq 620 nm is directly proportional to the specifically bound amount of GDH antigen in the respective sample. Considering the cut-off value results are interpreted as positive or negative.

Test Components

			For 96 Wells	For 2x 96 Wells
1	WELLS	Microtitration plate coated with polyclonal anti- <i>C.difficile</i> GDH antibodies (sheep)	12 single breakable 8-well strips colour coding green vacuum-sealed with desiccant	2x 12 single breakable 8-well strips colour coding green vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF CONC 10x	Wash buffer 10-fold	100 ml concentrate for 1000 ml solution white cap	2x 100 ml concentrate for 2x 1000 ml solution white cap
3	DIL	Sample diluent	100 ml · ready to use coloured yellow black cap	2x 100 ml · ready to use coloured yellow black cap
4	CONTROL +	Positive control Recombinant <i>C. difficile</i> GDH	2.0 ml · ready to use coloured blue red cap	4.0 ml · ready to use coloured blue red cap
5	CONTROL -	Negative control <i>C. difficile</i> GDH negative sample	2.0 ml · ready to use coloured blue green cap	4.0 ml · ready to use coloured blue green cap
6	CONJ HRP	HRP-conjugate HRP-labelled, monoclonal anti- <i>C.difficile</i> GDH antibodies (mouse)	15 ml · ready to use coloured green brown cap	25 ml · ready to use coloured green brown cap
7	SUBSTR TMB	Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	15 ml · ready to use blue cap	28 ml · ready to use blue cap
8	STOP	Stop solution 0.25 M sulphuric acid	15 ml · ready to use yellow cap	28 ml · ready to use yellow cap

Preparation and Storage of Samples

Collection and storage

Stool samples should be stored at 2...8°C immediately after collection and processed within 72 hours. Longer storage is possible at least at -20°C. Repeated (> 3x) freezing and thawing of samples should be avoided. Stool samples already diluted with the *Serazym*[®] sample diluent can be stored for up to 72 h at 2...8 °C before testing in the ELISA.

Preparation

Mix samples thoroughly. Pipette 1000 µl of sample diluent into a clean tube. Using a disposable stirring rod transfer about 200 mg (diameter about 4 - 6 mm) of faeces if solid or pipette 200 µl if liquid into the tube and suspend thoroughly. Spin down floating particles in a micro centrifuge at maximum speed for 1 min if necessary.

Materials required but not provided

Micropipettes · multi-channel pipette or multi-pipette · Reagent container for multi-channel pipette · 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer or 8-channel pipette · microplate reader with optical filters for 450 nm for measurement and ≥ 620 nm for reference · distilled or deionized water · glassware · tubes (2 ml) for sample preparation · orbital shaker for performance of test variant 2

Preparation and Storage of Reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1 x 96 or 2 x 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label, that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8°C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 2 months, provided proper storage. The ready to use wash solution can be used for at least one month when stored at 2...8°C.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the 10-fold concentrated wash buffer 1 + 9 with distilled or deionized water.

For Example: 10 ml wash buffer concentrate (2) + 90 ml distilled or deionized water.

Assay Procedure

The *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH can be performed in two ways:

1. Incubation without shaking; complete test duration 1 h and 10 minutes
2. Incubation with shaking; complete test duration 40 minutes

Dilute samples with sample diluent (3) 1 : 6 e.g. 200 mg or 200 µl stool + 1.0 ml sample diluent (3) and mix thoroughly.

Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.

Make sure the soak time of the wash buffer in the wells is at least 5 seconds per wash cycle and that residual fluid is completely drained in every single wash cycle!

Avoid direct light exposure of the TMB substrate solution!

Working steps variant 1: without shaking

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Dispense 3 drops (or 100 µl) **CONJ HRP** HRP-conjugate (6) per well and
3. Pipette: 100 µl **CONTROL +** positive control (4)
100 µl **CONTROL -** negative control (5)
100 µl **diluted sample**, mix gently
4. Cover plate and incubate for 60 min at RT.
5. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
6. Dispense 3 drops (or 100 µl) **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
7. Incubate for 10 min at RT protected from light.
8. Dispense 3 drops (or 100 µl) **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
9. Read OD at 450 nm / ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Working steps variant 2: with shaking

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Dispense 3 drops (or 100 μ l) **CONJ HRP** HRP-conjugate (6) per well and
3. Pipette: 100 μ l **CONTROL +** positive control (4)
100 μ l **CONTROL -** negative control (5)
100 μ l **diluted sample**, mix gently
4. Cover plate and incubate for 30 min at RT on an orbital shaker with a frequency of 500 – 700 / min.
5. Decant, then wash each well 5x with 300 μ l wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
6. Dispense 3 drops (or 100 μ l) **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
7. Incubate for 10 min at RT protected from light.
8. Dispense 3 drops (or 100 μ l) **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
9. Read OD at 450 nm / \geq 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Result Interpretation

Qualitative evaluation

Cut-off determination: OD negative control + 0.10

Samples with OD values equal to or higher than the cut-off value are considered positive, samples with OD values below the cut-off value are considered negative in the *Serazym*[®] C. difficile GDH.

Reference Values

<i>Serazym</i>[®] Clostridium difficile GDH	
Positive	\geq Cut-off
Negative	$<$ Cut-off

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges as usually done for other diagnostic parameters too. Therefore, the mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

Test validity

The test run is valid if:

- the mean OD of the negative control is \leq 0.20 (manual performance)
 \leq 0.30 (automatic performance)
- the mean OD of the positive control is \geq 1.00

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is followed correctly (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

Limitations of the procedure

The qualitative determination of *Clostridium difficile* GDH in stool specimens by enzyme immunoassay is not equivalent to the diagnosis of a *C. difficile* associated disease (CDAD). CDADs are caused by the toxins A and B of pathogenic *C. difficile* strains. Therefore, a positive GDH test result has to be supplemented by testing for toxins A and B, in order to confirm or exclude a toxigenic strain. On the other hand a negative GDH test result does not necessarily exclude a *C. difficile* infection. After dilution in sample diluent the samples should be tested by ELISA as quickly as possible, at least within 72 hours, because storage-depending antigen degradation may cause false negative results. More than 3 freeze-thaw cycles may also cause false negative results due to antigen degradation. As a result of inhomogeneous antigen distribution in some stool samples insufficient homogenizing may also cause false negative results. Cross contamination of reagents and samples can produce false positive results. Incorrect dilutions or solid particles after centrifugation of the suspension can cause false negative as well as false positive results. The overall interpretation of the ELISA results should always consider the microbiological examination as well as clinical findings.

Automatic Processing

Performing the *Serazym*[®] *Clostridium difficile* GDH on fully automated microplate processors (e.g. DS2 or DSX) may cause elevated absorbances in comparison to the manual procedure due to individual differences concerning wash procedures and general technical specifications of the equipment. In these cases a maximum value of 0.3 absorbance units is permissible for the negative control. It is recommended to use a wash procedure including 10 seconds soak time per strip and wash step followed by a wash step with distilled or deionized water with 10 seconds of soak time after the final wash step of each wash cycle. If necessary the number of washing steps can be enhanced from 5x to 7x - 8x.

Correlation: manual – automatic processing

A panel of 90 stool specimens (45 positive and 45 negative samples) was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with $r = 0.999$.

Performance Characteristics

Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV) calculated from 8-fold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	2.800	0.040	1.52
2	1.960	0.045	2.46
3	0.611	0.041	7.19
4	0.352	0.017	5.15

Inter-assay coefficient of variation (CV) in 5 different test runs calculated from twofold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	1.707	0.250	14.6
2	1.155	0.148	12.8
3	0.895	0.098	10.9
4	0.381	0.068	17.9

Lot-to-Lot reproducibility in 3 different production lots calculated from 8-fold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	1.840	0.166	9.0
2	1.285	0.172	13.4
3	0.349	0.093	26.6
4	0.026	0.005	17.6

Lower detection limit

The lower detection limit of Glutamatdehydrogenase (GDH) in the *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH was determined 10 ng/ml by titration of recombinant GDH antigen.

Sensitivity and specificity

Sensitivity in comparison to PCR

Ninety eight out of 102 stool specimens characterized *Clostridium difficile* positive by PCR were tested positive with the *Serazym*[®] ELISA corresponding to a sensitivity of 96.1%.

Comparative sensitivity and specificity

In two comparative studies 235 and 170 stool samples were tested in parallel in the *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH and 2 other commercially available ELISAs respectively.

Study 1

n = 235	comparative ELISA 1 positive	comparative ELISA 1 negative
<i>Serazym</i>[®] ELISA positive	101	3**
<i>Serazym</i>[®] ELISA negative	12*	119

Sensitivity: 89.4% · Specificity: 97.5%

* 10 out of 12 *Serazym*[®] ELISA negative and comparative 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	comparative ELISA 2 positive	comparative ELISA 2 negative
<i>Serazym</i>[®] ELISA positive	69	1*
<i>Serazym</i>[®] ELISA negative	3	97

Sensitivity: 95.8% · Specificity: 98.9%

* This sample was confirmed true positive by PCR.

Specificity amended: 100%

Cross reactivity

Negative stool specimens have been spiked with $\geq 10^8$ colony forming units of the following microorganisms and tested negative with the *Serazym*[®] ELISA (OD 450 / 620 nm < 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>	(ATCC 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>	Clinical isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i> Serotyp <i>O3, O9</i>	Clinical isolates

Interference

None of the following substances added to GDH positive and negative stool samples showed a significant impact on the test result:

barium sulphate (5%), Buscopan® (2 mg/ml), cyclamate (5%), Diclofenac (2 mg/ml), haemoglobine (5 mg/ml), Hylak® N (5%), Immodium® akut duo (0.2/12.5 mg/ml), Iberogast® (5%), 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), Simagel® (2 mg/ml), stearic acid (20%), vancomycin hydrochloride (0.5%).

Common Advices and Precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instructions carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. Do not use reagents from damaged packages or bottles. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. **Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution.**

The sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution is universally applicable for the *Serazym*® stool ELISA 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), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) and Giardia (E-106).

Do not use reagents from other manufacturers. Avoid time shift during dispensing of reagents. All reagents should be kept at 2...8°C before use. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous. Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should generally be observed:

Do not smoke, eat or drink while handling kit material!

Always use protective gloves!

Never pipette material by mouth!


Note safety precautions of the single test components!






History of Changes











Version	Section	Modifications
2021-02-02	Preparation And Storage Of Samples, Assay Procedure	Update

Incubation Scheme *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH (E-107)

1.  3 drops (or 100 µl) **CONJ HRP** (6)
 +
 pipette
 100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **stool sample**, mix gently
 60 min incubation (room temperature)
alternatively 30 min while shaking

 5x wash with wash solution
2.  3 drops (or 100 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min incubation protected from light (room temperature)
without shaking
3.  3 drops (or 100 µl) **STOP** (8)

Read OD at 450 / ≥ 620 nm

 Manufacturer	 Date of manufacture	 Use by	LOT Batch code	REF Catalog number
 Keep away from sunlight	 Temperature limits	 Biological risks	 Do not reuse	
 Consult instructions for use	 Caution	IVD <i>In-vitro</i> -diagnostic medical device	 Contains sufficient for <n> tests	

