

Clostridium difficile Toxin A/B-Nachweis

Die neue RIDASCREEN® Version

Erreger und Krankheit



Seit seiner Entdeckung 1935 als harmloser Darmkommensale hat sich *C.difficile* bis zum heutigen Tage einen bedeutenden Platz im Kreise der wichtigsten Nosokomialkeime geschaffen. Er steht gar an der Spitze, wenn es um die Ursache der Antibiotika-assoziierten Durchfallerkrankung (AAD) geht. Aber auch Chemotherapeutika und andere faktorielle Einflüsse, die in der Lage sind, die normale Darmflora zu beeinträchtigen und zu schädigen, bereiten in der Folge den Boden für eine erfolgreiche Kolonisation mit *C.difficile*.

Während Neugeborene und Kinder im ersten Lebensjahr bis zu 65 % mit toxischen und atoxigenen Stämmen ohne irgendwelche Krankheitszeichen besiedelt sind, reduziert sich diese Rate klinisch inapparenter *C.difficile*-Träger auf unter 3 % im Erwachsenenalter. Die hohe Besiedlung im ersten Lebensjahr, die am Ende des 2. Lebensjahres signifikant abnimmt, wird begünstigt durch das Fehlen einer protektiven Darmflora, die sich in dem frühkindlichen Darm erst noch etablieren muss.

Warum die Kinder in dieser frühen Lebensphase keine *C.difficile*-assoziierte Diarrhoe (CDAD) erleiden, liegt im wesentlichen am Fehlen von Rezeptoren des noch unreifen Intestinaltraktes gegen die wirksamen *C.difficile*-Toxine, aber auch teilweise an dem protektiven Effekt der grösseren Mengen an Schleim, die in diesem frühen Alter von der Darmmukosa sezerniert werden.

Das was *C.difficile* hauptsächlich zu einem bedeutenden Pathogen macht, ist die Bildung zweier Toxine, die mit 308 und 270 kDa zu den größten derzeit bekannten bakteriellen Toxinen gehören. Beide wirken sie zytotoxisch, wobei To-

xin B um ein vielfaches stärker wirkt als Toxin A. Sie gelangen Rezeptorvermittelt durch einen Endozytose-artigen Vorgang ins Zellinnere. Die Toxinbedingte Gewebsschädigung führt zur Sekretion von Flüssigkeit in das Darmlumen und somit zur klinisch apparenten Diarrhoe. Eine schwere Verlaufsform äussert sich in einer pseudomembranösen Colitis, die tödlich verlaufen kann. Die Virulenz der verschiedenen *C.difficile*-Stämme kann sehr unterschiedlich sein, sowohl was die Menge als auch die Art der gebildeten Toxine betrifft. Während die meisten der toxischen Stämme beide Toxine bilden, werden auch Stämme gefunden, die nur A- oder B-Toxin produzieren, wobei die reinen Toxin B-Produzenten häufiger vorkommen.

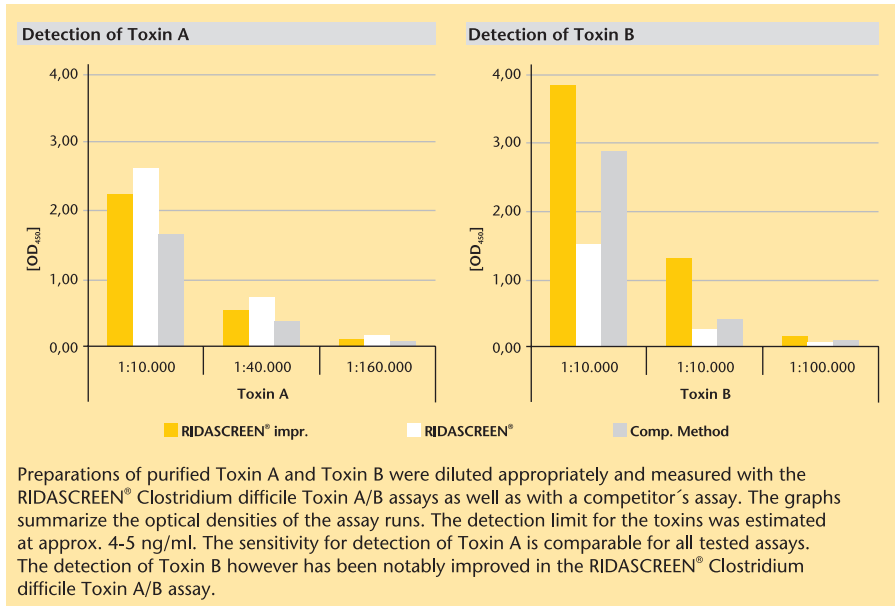
Diagnostik

Die Erkenntnis der unterschiedlichen Toxinbildung hat schon immer jene Nachweisteste präferiert, die in der Lage sind, beide Toxine nachzuweisen. Während einige Elisa-Anbieter, die zunächst nur mit Toxin A-Nachweistesten am Markt waren, mittlerweile fachgerecht auf den Nachweis von A und B nachgerüstet haben, hat sich der RIDASCREEN® *C.difficile* A/B-Test von Anfang an in der richtigen und notwendigen Form präsentiert.

Aufgrund seiner diagnostischen Zuverlässigkeit hat er sich seit 1993 zu einem heute breit akzeptierten Nachweisverfahren etabliert. Die Verwendung zweier Konjugate in einem Biotin-Streptavidin getriggerten System zur Erzielung einer hohen Sensitivität bedingte ein 2,5 Stunden Protokoll, was zunehmend als Handlingsnachteil kritisiert wurde.

Hierauf hat R-Biopharm mit der Entwicklung eines neuen hochsensitiven Anti-Toxin B-Antikörpers reagiert. Damit wurde es möglich auf das Biotin-

Tabelle 1



Streptavidin-Verstärkersystem zu verzichten und eine Direktmarkierung mit dem Peroxidase-Enzym vorzunehmen. Dadurch konnte nicht nur eine Verkürzung der Testdauer um fast eine Stunde erreicht werden, sondern sogar eine deutliche Steigerung der Sensitivität gegenüber dem Toxin B.

Wie die **Tabelle 1** eindrucksvoll belegt erreicht man bei reinem Toxin nahezu eine Verdopplung der Signalstärke im Elisa.

Eine Validierung mit Stuhlproben im Vergleich zu einem insbesondere in Kanada und den USA hochgeschätzten und weitverbreiteten Konkurrenztest ist in der **Tabelle 2** wiedergegeben.

Beide Tabellen sind einem Poster entnommen, das auf der diesjährigen 73. und jährlich stattfindenden klinisch-mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostikkonferenz in Kanada (CACMID) grosse Aufmerksamkeit und Anerkennung fand. Das Poster kann auf Wunsch als PDF angefordert werden.

Diese neue Elisa-Version des RIDASCREEN® C.difficile A/B wird voraussichtlich ab November die bisherige Version ablösen, und wie die Datenlage zeigt, mehr als nur ersetzen.

Weitere Info erhalten sie von Helmut Leidinger unter h.leidinger@r-biopharm.de

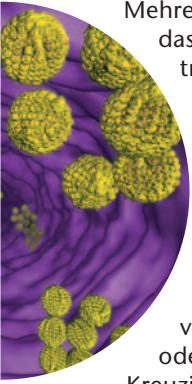
Tabelle 2

Sensitivity and Specificity			
A			
	Standard		
RIDASCREEN® Impr.	pos	neg	
pos	30	0	
neg	1	48	
	96,8 %	100,0 %	
	Sensitivity	Specificity	
B			
	Standard		
Comp. Method	pos	neg	
pos	30	2	
neg	1	46	
	96,8 %	95,8 %	
	Sensitivity	Specificity	

The table summarizes the calculation for sensitivity and specificity of the improved RIDASCREEN® Clostridium difficile Toxin A/B assay. A total of 79 previously characterized clinical samples (48 negative; 31 positive) were included in the study. The sensitivity for the improved RIDASCREEN® assay was calculated with 96.8 %, specificity was determined with 100 % in this study. The results are comparable to a commercially available competitor's assay as seen from table B.

Noroviren

Ist die zunehmende Detektion von Noroviren das Ergebnis besserer Applikationen weiterentwickelter Diagnostika oder existieren Hinweise dafür, dass Noroviren eine zunehmende Problematik darstellen?



Mehrere Berichte haben gezeigt, dass Norovirus-induzierte Gastroenteritis Ausbrüche global aber auch national periodisch verstärkt wiederkehren. Besonders auffallend dabei war die Untergruppe vier innerhalb der Genogruppe zwei (GG II/4). Ob diese Untergruppe virulenter als andere Vertreter der Noroviren ist, leichter übertragbar oder auch nur eine verminderte Kreuzimmunität gegen diesen Typ in der Bevölkerung besteht, ist bis heute nicht geklärt. Das Phänomen des periodisch immer wieder verstärkten Auftretens hat wahrscheinlich auch in der Vergangenheit mehrmals stattgefunden. Jedoch wissen wir nicht, ob Norovirus-Infektionen seit 1929, als Zahorsky diese erstmalig als „winter vomiting disease“ beschrieb, zugenommen haben. Obwohl verlässliche retrospektive Daten fehlen um eine definitive Antwort auf diese Frage zu finden, unterstützen verschiedene Faktoren die Vermutung, dass die Prävalenz von Norovirus-Infektionen heutzutage doch deutlich höher ist.

Was spricht für eine höhere Prävalenz?

Zunächst ist heute zu beobachten, dass bakteriell-induzierte Nahrungsmittelerkrankungen einen relativ immer kleineren Anteil, an den gemeldeten Gastroenteritis Fällen ausmachen. Dazu tragen sicher die verbesserten Kühlketten der Nahrungsmittel bei. Die Kontamination von Lebensmittel

kann auch durch ein gutes Hygiene-Management und geeignete Desinfektionsmittel vermieden werden. Die meisten dieser Maßnahmen jedoch sind ineffektiv um einer Norovirus-Infektion vorzubeugen oder diese zu bekämpfen.

Noroviren sind sehr resistent gegen verschiedene Desinfektionsmittel und überstehen auch Temperaturen deutlich unter 0 °C. Sie verbleiben sehr lange auf Oberflächen und nur 10-100 Partikel sind ausreichend, um eine Infektion auszulösen.

Darüber hinaus beobachten wir Gesellschaftsveränderungen, die dazu beitragen, dass immer mehr ältere Menschen ihren Lebensabend in Pflegeheimen verbringen und somit die Ansteckungsgefahr enorm zugenommen hat. In den USA zum Beispiel ist die Bettenzahl in Pflegeheimen von 1972 bis heute um über 75 % gestiegen.

Nicht zu vergessen ist die Tatsache, dass uns der heute höhere Lebensstandard ermöglicht mehr auswärts zu essen als noch vor 30 Jahren.

Des Weiteren hat sich unser Essverhalten in den letzten 30 Jahren deutlich geändert. Wir konsumieren heute 20 % mehr rohes Gemüse oder frische Früchte.

Letztlich erhöht die zunehmende Reiseintensität in einer globalisierten Welt die Gefahr eine Norovirus-Infektion zu erleiden durch eine gehäufte oder vermehrt stattfindende Exposition in Hotels, Flugzeugen oder auch Kreuzfahrten.

Norovirus Aktuell

Norovirus-induzierter Ausbruch in einer Jugendherberge belegt Problematik des Virusnachweis mittels PCR.

Einmal mehr konnte Anfang Juni 2005 ein Norovirus-bedingter Gastroenteritis Ausbruch in einer Jugendherberge bei Rosenheim bestätigt werden.

Bemerkenswert dabei jedoch ist die Tatsache, dass der Norovirusgenom-

nachweis erst im Robert Koch-Institut (RKI) nur mit Hilfe der nested PCR gelang und nicht mit der heutzutage weit verbreiteten und in der Routine eingesetzten RT-PCR, die nahezu völlig versagte.

Zusätzliche Sequenzierungsuntersuchungen ermittelten als Ursache den Genotyp zwei (Melksham, GG II/2) innerhalb der Genogruppe II als Erreger

(nachzulesen im „Epidemiologisches Bulletin“ Nr. 25).

Ein zweiter Ausbruch mit dem gleichen Erregertyp in Prien am Chiemsee wurde ebenfalls erst im zweiten Anlauf im RKI bestätigt. Auch hier versagte die erste PCR-Analyse (Epidemiologisches Bulletin Nr. 24).

Eine Probe eines Betroffenen Schülers, die aufgrund verwandtschaftlicher Beziehungen zu einem unserer Mitarbeiter im RIDASCREEN® Norovirus ELISA getestet werden konnte, zeigte eindeutig ein positives Ergebnis.

Wir haben in der Vergangenheit des öfteren versucht die vielen Unstimmigkeiten, bezüglich des Erregernachweis auf genomischer Ebene (PCR) zu verdeutlichen und gleichzeitig die Vorteile des Erregernachweis auf Proteinebene (ELISA) hervorzuheben – gerade in der Routine Diagnostik.

Beide Fälle zeigen in besonderem Maße, dass eine absolut verlässliche Methode zur Ursachenfindung heute noch nicht existiert. Der einzelne Nachweis einer Norovirus-Infektion

muss auch heutzutage sehr kritisch betrachtet werden. Fehlen die typischen klinischen Merkmale einer Norovirus-Infektion, sollte im Einzelfall eine zweite Methode zur Abklärung der Ursache herangezogen werden. Unsere nunmehr über zweijährige Erfahrung auf dem Gebiet der Norovirus-Diagnostik hat uns dabei immer wieder gelehrt, dass wir auch in Zukunft mit diskrepanten Ergebnissen werden rechnen müssen.

Für weitere Informationen und bei Fragen bezüglich der Norovirus-Diagnostik steht Ihnen unser Projektmanager Herr Dr. Georgios Kiourkenidis unter folgender Telefonnummer sehr gerne zur Verfügung (06151) 8102-96 oder Sie nehmen per E-Mail (g.kiourkenidis@r-biopharm.de) Kontakt auf.



RIDA® Soft A.M.Sys

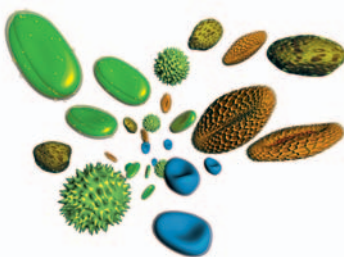
Das neue Allergie-Management-System für Ihre Allergie-in-vitro-Diagnostik

Zu einer modernen und leistungsfähigen Allergie-in-vitro-Diagnostik gehört neben den eigentlichen Reagenzien auch eine leistungsfähige Software zur einfachen und komfortablen Auswertung und Archivierung der Tests und zur kompletten Verwaltung der Patienten- und Einsender-Daten.

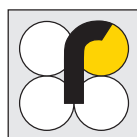
Auf die Qualität der Reagenzien kann man sich seit Inkrafttreten der in-vitro-Diagnostika-Richtlinien (IvD-Richtlinie) und damit verbunden die Einführung der CE-Markierung, ohne die in der europäischen Union kein in-vitro Diagnostikum mehr verkauft werden darf, weitestgehend verlassen. Daher unterscheiden sich die Anbieter von Labordiagnostika im weiteren Leistungsangebot wie Komfort der Abarbeitung, elektronische Datenübertragung und -sicherung, Erfüllung

von Anforderungen der Qualitätssicherung etc., das wesentlich von der bereitgestellten Software bestimmt wird.

Um die Durchführung der Allergie-in-vitro-Diagnostik schnell, sicher und kostengünstig durchführen zu können, hat R-Biopharm nun zu seinem Konzept der vorbestückten Platte für spezifisches IgE bzw. IgG und Total IgE eine neue Software entwickelt, die allen Ansprüchen an hohe Funktionalität, sichere Datenübertragung und



r-biopharm



Datenarchivierung genügt. Selbst zukünftig wichtiger werdende Aspekte in der Qualitätssicherung und – rückverfolgung sind bereits integriert.

Hier nur einige Highlights der neuen Software RIDA® Soft A.M.Sys:

- Dateneingabe manuell oder Übernahme der Aufträge aus der Labor-EDV (bidirektionale online-Anbindung an Labor-EDV)
- Suchen und Ändern von bereits eingegebenen Aufträgen
- Arbeiten mit voreingestellten Panels
- Bestellen der Reagenzien per Fax oder online
- Komfortable Verwaltung aller Patienten und Einsender
- Erstellen des eigenen Briefkopfes im Befund
- Übertragung der Befunde an Einsender als PDF Datei online möglich
- Übertragung der Befunde in Labor-EDV (bidirektionale online-Anbindung an Labor-EDV)
- Archivierung aller Befunde
- Zu jedem gemessenen Allergen werden die dazugehörige Werte

- der Standardkurve, die graphische Darstellung und die Messdaten der Qualitätskontrollen mitgespeichert.
- Suchen von Befunden nach Datum oder Namen oder Einsender
- Datensicherung in 3 verschiedenen Datenfiles.
- und vieles mehr.

Damit bietet Ihnen R-Biopharm eine Software = viele Vorteile

Für mehr Informationen über unser Gesamtangebot in der Allergie-in-vitro-Diagnostik wie

- **breite Allergenpalette (>700 Allergene)**
- **vorbestückte Platte = einfache Handhabung**
- **Kein Verfall von Reagenzien oder seltenen Allergenen = kostengünstig**
- **eine professionelle Software**

wenden Sie sich bitte an unseren Produktmanager Allergiediagnostik, Herrn Joachim Zehender unter 06151-8102-45 oder 0172-6616273.

Neues RF-Absorbens für die Sero EIA von R-Biopharm

Serologische Untersuchungen auf IgM-Antikörper können prinzipiell auf zweierlei Art beeinflusst werden und so zu falschen Ergebnissen führen:

- 1) Im Vergleich zu IgM-Antikörpern sind IgG-Antikörper im Laufe einer Infektion im Überschuss vorhanden. Aus diesem Grund können IgG-Antikörper einen IgM-Nachweis durch Blockierung der spezifischen Bindungsstellen negativ beeinflussen. Eine Untersuchung auf IgM kann falsch negativ ausfallen.
- 2) Rheumafaktoren können hingegen einen IgM-Nachweis falsch positiv beeinflussen. Rheumafaktoren sind häufig Antikörper der Klasse IgM (IgM-RF), die gegen den konstanten Teil (Fc) von IgG-Antikörpern gerichtet sind. Nach spezifischer Bindung von IgG-Antikörpern an das Testantigen binden IgM-RF an deren Fc-Teil. Zugegebenes Anti-human-IgM-Konjugat würde dann durch Bindung an die Rheumafaktoren ein IgM-positives Ergebnis vortäuschen.

Für eine korrekte Bestimmung von IgM-Antikörpern ist deshalb grundsätzlich eine Absorption von IgG-Antikörpern empfehlenswert. Bisher war

dies oft sehr kompliziert. Zunächst musste das Serum in einem bestimmten Verhältnis mit dem Absorbens gemischt und inkubiert werden. Erst danach konnte das Serum auf die im Test benötigte Verdünnung eingestellt werden. Mehrere Pipettierschritte waren hierfür notwendig. Mit dem neuen RIDA® RF-Absorbens wird dies nun einfacher. Durch Zugabe zum Probenverdünnungspuffer der RIDASCREEN® Sero EIA (SeroPP) kann sich der Anwender einen gebrauchsfertigen IgM-Absorptionspuffer herstellen.

Der Absorptionspuffer kann bis zu einer Woche bei 2 – 8 °C aufbewahrt werden, ohne an Aktivität zu verlieren. Mit diesem Puffer kann nun in einem einzigen Pipettierschritt die Probenverdünnung und -absorption durchgeführt werden (z.B. 10 µl Probe + 990 µl Absorptionspuffer für eine 1:100 Verdünnung). Besonders vorteilhaft ist dies auch für die Verdünnung und Testdurchführung auf ELISA-Automaten. Manche Geräte erlauben keinen zusätzlichen Pipettierschritt für die Absorption der Proben. Durch Verdünnung und Absorption in einem Arbeitsschritt ist nun eine optimale Nutzung solcher Geräte möglich.

Messen und Tagungen



24. – 28.07.2005	AACC 2005 – International Congress of Clinical Chemistry Orlando, Florida, U.S.
10. – 14.09.2005	WCOG 2005 – 13th World Congress of Gastroenterology Montreal/QC, Canada
11. – 15.09.2005	10th International Conference of Lyme Borreliosis and the other Tick-Borne Diseases, Vienna, Austria
25. – 28.09.2005	57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) Göttingen, Germany
13. – 14.10.2005	XVIII. Annual Workshop of the European Helicobacter Study Group (EHSg) Copenhagen, Denmark
04. – 09.11.2005	Annual Convention of the American College of Allergy, Asthma and Immunology (ACAAI) Anaheim/CA, U.S.
12.11.2005	Gastro-Symposium der R-Biopharm AG Berlin, Germany
16. – 19.11.2005	MEDICA 2005 – 37. Weltforum der Medizin – Internationale Fachmesse mit Kongress Düsseldorf, Germany
28.11. – 02.12.2005	Zdravochranenje Russia

R-Biopharm^{news} herausgegeben von

R-Biopharm AG
Landwehrstraße 54, 64293 Darmstadt
Telefon: (0 61 51) 81 02 - 0
Telefax: (0 61 51) 81 02 - 40

r-biopharm

