












Serazym[®] Clostridium difficile Toxin A+B

Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von *Clostridioides difficile*-spezifischen Enterotoxin TcdA (Toxin A) und Zytotoxin TcdB (Toxin B) in Stuhlproben humanen Ursprungs oder in Kultursuspensionen

REF	E-040	Σ	96
IVD	In-vitro-Diagnostikum		CE



Seramun Diagnostica GmbH • Spreenhagener 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
Σ Ausreichend für <i>n</i> Prüfungen	 Biologisches Risiko	 Temperaturbereich
		 Achtung

Zweckbestimmung

Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B ist ein IVD-Test zur qualitativen Bestimmung von *Clostridioides* (früher: *Clostridium*) *difficile*-spezifischem Enterotoxin TcdA (Toxin A) und Zytotoxin TcdB (Toxin B) in Stuhlproben humanen Ursprungs oder in Kultursuspensionen zur manuellen oder semi-automatischen Abarbeitung durch einen Fachanwender in Laborumgebung.

Er dient der Diagnosehilfe einer *C. difficile*-Infektion (CDI) in Proben von Patienten mit Symptomen einer *C. difficile*-assoziierten Durchfallerkrankung.

Testprinzip

Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B ist ein Enzymimmunoassay auf der Basis monoklonaler Antikörper gegen die Toxine A und B von *Clostridioides* (früher: *Clostridium*) *difficile*. Verdünnte, unbehandelte Stuhlproben oder Kultursuspensionen sowie Negativ- und Positivkontrolle werden in die mit monoklonalen anti-Toxin A- und anti-Toxin B-Antikörpern beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatte dosiert. Nach Inkubation werden ungebundene Komponenten durch einen Waschschrift entfernt und biotinylierte, monoklonale anti-Toxin A- und anti-Toxin B-Antikörper in die Kavitäten dispensiert. Nach Inkubation werden ungebundene Komponenten durch einen Waschschrift entfernt. Die gebundenen biotinylierten Antikörper reagieren in einem weiteren Inkubationsschritt mit Streptavidin-Peroxidase (HRP)-Konjugat. Nach einem erneuten Waschschrift setzt die HRP 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 der spezifisch gebundenen *C. difficile* Toxin A- und B-Antigene direkt proportional.

Testkomponenten (Lieferumfang)

		Für 96 Kavitäten	
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit < 15 µg/mL monoklonalen anti-Toxin A- und anti-Toxin B- Antikörpern (Maus)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten, Farbmarkierung rot, vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF (10x)	Waschpuffer (10x) Seramun® Wash buffer A TRIS-basierter Puffer	100 mL Konzentrat für 1000 mL Lösung, farblos, weiße Kappe
3	DIL	Probenpuffer Seramun® Sample diluent A Phosphat-basierter Puffer	100 mL, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, schwarze Kappe
4	CONTROL +	Positivkontrolle < 5 µg/mL rekombinantes <i>C. difficile</i> -Antigen	2,0 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt, rote Kappe
5	CONTROL -	Negativkontrolle TRIS-basierter Puffer	2,0 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt, grüne Kappe
6/1	CONJ BIOTIN	Biotin-Konjugat < 1 µg/mL biotinylierte, monoklonale anti-Toxin A- und anti-Toxin B-Antikörper (Maus)	15 mL, gebrauchsfertig, grün gefärbt, weiße Kappe
6/2	CONJ STREPT	Streptavidin-HRP-Konjugat < 1 µg/mL	15 mL, gebrauchsfertig, rot gefärbt, grüne Kappe
7	SUBSTR	Substrat SeramunBlau® automat fast < 0,1 % 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin; < 0,05 % Wasserstoffperoxid	15 mL, gebrauchsfertig, farblos, blaue Kappe

8	STOP	Stopplösung SeramunBlau® stop 0,25 M Schwefelsäure	15 mL, gebrauchsfertig, farblos, gelbe Kappe
9		Analysenzertifikat	1 Stück
10		Gebrauchsanweisung	1 Stück

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette • 8-Kanal-Mikropipette bzw. Multikanal-Mikropipetten mit Pipettenspitzen • Reagenzienbehälter zur Dispensierung mit Multikanal-Mikropipette • 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 • Horizontalschüttler bei Testdurchführung mit Schüttler

Wichtige Hinweise



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

Die Gebrauchsanweisung 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, Negativkontrolle, Substrat und Stopplösung erlaubt.

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

Alle im Zusammenhang mit Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B 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. Reagenzien mit Anzeichen einer Kontamination sollten nicht verwendet werden.

Jede Kavität der Mikrotiterplatte kann nur einmal benutzt werden. Jede Probe und Kontrolle muss mit einer neuen Pipettenspitze pipettiert werden. Positiv- und Negativkontrolle sind gebrauchsfertig.

Bei größeren Probenserien empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette, um Zeitverzögerungen und Kontaminationen 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 Haut und 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 Gebrauchsanweisung 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)	<p>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.</p> <p>EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.</p> <p>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</p>
DIL	<p>Enthält Material tierischen Ursprungs.</p> <p>Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid</p>
CONTROL +	<p>Enthält Material mikrobiellen und tierischen Ursprungs.</p> <p>Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid</p>
CONTROL -	<p>Enthält Material tierischen Ursprungs.</p> <p>Konservierungsmittel: < 0,01 % Natriumazid</p>
CONJ BIOTIN	<p>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.</p> <p>EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.</p> <p>Enthält Material mikrobiellen und tierischen Ursprungs.</p> <p>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</p>
CONJ STREPT	<p>EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.</p> <p>Enthält Material tierischen Ursprungs.</p> <p>Konservierungsmittel: < 0,00015 % 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</p>
SUBSTR	<p>Gefahrbestimmende Komponente: 2-Pyrrolidon</p> <p>Signalwort: Gefahr</p> <p></p> <p>H360: Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.</p> <p>P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.</p> <p>P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.</p>

Testkomponente	Gefahrenkennzeichnung und ergänzende Angaben zu Inhaltsstoffen
	P308+P313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. 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)
STOP	-

Grenzen der Methode

Der qualitative enzymimmunologische Nachweis der Toxine A und B von *Clostridioides difficile* in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle 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. Formalin-behandelte Proben können falsch positive Werte hervorrufen und dürfen daher im Test nicht eingesetzt werden. Ein negatives Ergebnis im Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B schließt 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. 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

Stuhlprobe in geeignetem Probenentnahmegefäß sammeln.

Beispiel: Stuhlröhre, mit Löffel, Schraubverschluss, (LxØ): 107 x 25mm, transparent

Probenhaltbarkeit und -lagerung

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

Beispiel: 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 Waschpuffer (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. Je 100 µL **CONTROL +** Positivkontrolle
100 µL **CONTROL -** Negativkontrolle
100 µL **verdünnte Stuhlprobe** oder **Kultursuspension** pipettieren.
3. Platte abdecken und 60 min bei RT inkubieren.
4. Dekantieren und 5-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen.
Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 120 µL **CONJ BIOTIN** .Biotin-Konjugat pro Kavität hinzugeben.
6. Platte abdecken und 30 min bei RT inkubieren.
7. Dekantieren und 5-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen.
Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 120 µL **CONJ STREPT** Streptavidin-HRP-Konjugat pro Kavität hinzugeben.
9. Platte abdecken und 30 min bei RT inkubieren.
10. Dekantieren und 5-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen.
Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
11. 120 µL **SUBSTR** Substrat pro Kavität hinzugeben.
12. 15 min **lichtgeschützt** bei RT inkubieren.
13. 120 µL **STOP** Stopplösung pro Kavität hinzugeben, kurz schütteln.
14. 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 + 0,20

Proben mit OD-Werten, die über dem errechneten Cut-off liegen, sind als positiv, Proben mit OD-Werten, die mehr als 10 % unter dem errechneten Cut-off liegen, sind als negativ zu bewerten. Proben mit OD-Werten, die innerhalb von 10 % unterhalb des errechneten Cut-offs liegen, sind als grenzwertig zu beurteilen und müssen wiederholt getestet werden. Gegebenenfalls ist eine zweite Stuhlprobe des entsprechenden Patienten zu analysieren.

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 Gebrauchsanweisung 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	≥ Cut-off
Grenzwertig	0,9 x Cut-off – 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 3 Proben mehrfach bestimmt. Für die Bestimmung des Intra-Assay-Variationskoeffizienten (VK) wurden die Proben in einer 8-fachen Bestimmung in einem Testlauf vermessen. Die Bestimmung des Inter-Assay-Variationskoeffizienten erfolgte in einer 8-fachen Bestimmung in 5 verschiedenen Testläufen an zwei Tagen.

Probe	Intra-Assay-Variationskoeffizient		Inter-Assay-Variationskoeffizient	
	\bar{x} OD	VK (%)	\bar{x} OD	VK (%)
1	1,386	3,0	1,321	7,7
2	0,506	3,3	0,485	6,9
3	0,332	8,5	0,345	10,8

Sensitivität und Spezifität

Im Rahmen einer Studie wurden insgesamt 154 Stuhlproben parallel im Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B und einem anderen kommerziellen ELISA untersucht.

n = 154	ELISA positiv	ELISA negativ
Serazym® ELISA positiv	103	4
Serazym® ELISA negativ	2	45

Sensitivität: 98,1 %

Spezifität: 91,8 %

Kreuzreaktivität

Die Untersuchung von Stuhlproben mit einem positiven Erregernachweis der folgenden Spezies ergab keine falsch positiven Ergebnisse im Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B:

Aeromonas caviae; *Aeromonas hydrophila*; *Campylobacter spec.*; Enterohämorrhagische *Escherichia (E.) coli* (EHEC); *Hafnia alvei*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec.*; *Salmonella typhimurium*; *Staphylococcus aureus*, nicht Enterotoxin bildend; *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin bildend; *Yersinia enterocolitica* O:3.

Negative Stuhlsuspensionen wurden mit folgenden Mikroorganismen mit einer Keimzahl von $\geq 10^8$ Kolonie-bildenden Einheiten pro mL in Probenpuffer getestet und im Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B 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>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>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>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)

Der getestete Stamm von *Clostridium sordellii* (ATCC 9714) zeigte keine Kreuzreaktivität im Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B. In der Literatur sind Kreuzreaktivitäten von anti-*C. difficile*-Toxin-Antikörpern mit *C. sordellii*-Toxinen bestimmter Stämme beschrieben.

Aplikation

Testansatz aus Kultursuspensionen (toxigene Kultur)

Über 48 h auf Blut- oder CCFA-Agar gewachsene *Clostridioides difficile*-Kolonien können direkt im Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B auf Toxin A und B untersucht werden. Hierzu ist eine Bakteriensuspension herzustellen, deren Dichte dem McFarland Standard 1 entspricht (OD bei 600 nm = 0,20 - 0,25 nach Nullabgleich gegen das Seramun® Sample diluent A):

In ein Reaktionsgefäß 1000 µL Verdünnungsmedium pipettieren. 2 - 4 Impfösen *C. difficile*-Kolonien abnehmen und in das Verdünnungsmedium einrühren. Probe durch kräftiges Schütteln auf einem Vortex-Gerät resuspendieren, ggf. Bakteriendichte durch Trübungsmessung bei 600 nm prüfen (s.o.). 100 µL der Suspension direkt im ELISA einsetzen.

Bei Verwendung von Selektivmedien kann die nachweisbare Toxinmenge in Abhängigkeit von den in diesen Medien enthaltenen Hemmstoffen reduziert sein, was zu (im Vergleich zu Vollmedien) verringerten OD-Werten im ELISA führen kann. Bei toxigener Kultur von Selektivmedien muss daher auf Einsatz einer ausreichend hohen Bakteriendichte geachtet werden, die mindestens McFarland Standard 4 (OD 600 nm > 1,0 nach Nullabgleich gegen das Seramun® Sample diluent A) entspricht. Zum Erreichen dieser Bakteriendichte ist die Resuspendierung der *C. difficile*-Kolonien von mindestens einer halben, dicht bewachsenen Platte erforderlich.

Gegebenenfalls ist den Empfehlungen und Angaben der Medienhersteller zu folgen, die Angaben zum Einfluss der in den entsprechenden Medien verwendeten Zusätze auf die Toxinproduktion und damit zur prinzipiellen Eignung eines Mediums für die toxigene Kultur machen können.

Testdurchführung mit Schüttler

1. Testreagenzien und benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je 100 µL **CONTROL +** Positivkontrolle
100 µL **CONTROL -** Negativkontrolle
100 µL verdünnte Stuhlprobe oder Kultursuspension pipettieren.
3. Platte abdecken und 30 min bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 – 700 U / min inkubieren.
4. Dekantieren und 5-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen.
Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 120 µL **CONJ BIOTIN** Biotin-Konjugat pro Kavität hinzugeben.
6. Platte abdecken und 15 min bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 - 700 U / min inkubieren.
7. Dekantieren und 5-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen.
Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 120 µL **CONJ STREPT** Streptavidin-HRP-Konjugat pro Kavität hinzugeben.
9. Platte abdecken und 15 min bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 – 700 U / min inkubieren.
10. Dekantieren und 5-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen.
Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
11. 120 µL **SUBSTR** Substrat pro Kavität hinzugeben.
12. 15 min **lichtgeschützt** bei RT inkubieren (nicht schütteln).
13. 120 µL **STOP** Stopplösung pro Kavität hinzugeben, kurz schütteln.
14. Messen der OD bei 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min.

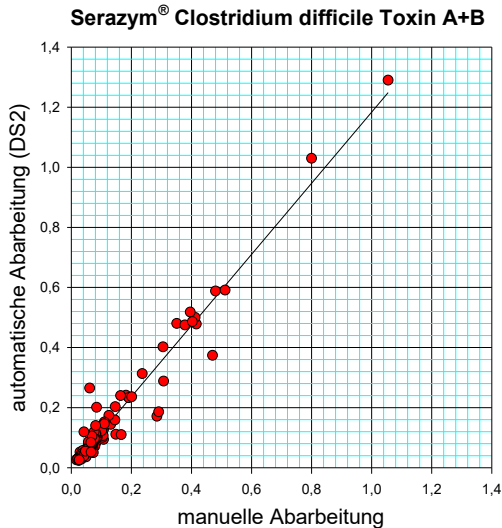
Automatische Abarbeitung

Es liegt in der Eigenverantwortung des Anwenders, die Mikrotiterplatten-Automaten und zugehörige Anwendungsdateien vor Verwendung mit diesem Produkt zu validieren. Für zugehörige Anwendungsdateien zur Nutzung der unten genannten Mikrotiterplatten-Automaten kann der örtliche Distributor kontaktiert werden.

Bei Abarbeitung des Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B auf einem Mikrotitrationsplatten-Vollautomaten (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 Waschschrift auf 7x bis 8x erhöht werden.

Korrelation: manuelle – automatische Abarbeitung

Im Rahmen der Untersuchung von 125 Stuhlproben wurde bei parallel durchgeführter manueller und automatischer Abarbeitung (DS2®, Dynex Technologies) ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,976$ ermittelt.



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2026-04	Deckblatt	Anpassung Artikelnummer an Verpackungskonzept
	Testkomponenten (Lieferumfang)	Anpassung Volumina an Verpackungskonzept, Ergänzung Menge oder Konzentration des wirksamen Bestandteils
	Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel	Ergänzung „Reagenzienbehälter zur Dispensierung mit Multikanal-Mikropipette“
	Wichtige Hinweise	Aufnahme der Negativkontrolle als Lot - und Produktübergreifende Komponente; Tabelle unter „Sicherheitshinweise“ Anpassung an die Kennzeichnung auf dem Etikett
	Behandlung der Proben	Ergänzung Beispiel Probengefäß
	Testdurchführung	Anpassung an Verpackungskonzept
2026-05	Testdurchführung	Anpassung „Platte abkleben“ zu „Platte abdecken“
	Applikation: Automatische Abarbeitung	Aufnahme der Eigenverantwortung des Anwenders zur Validierung von Mikrotiterplatten-Automaten