

Serazym[®] Verotoxin 1+2

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Verotoxin 1 und 2 (Shiga Toxin 1 und 2) in Stuhlproben

REF E-030 ▽ 96 REF E-030-A2 ▽ 2x 96 IVD *In-vitro*-Diagnostikum CE



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

Invasive und toxinbildende *Escherichia coli*- Stämme führen zu Durchfallerkrankungen bei Säuglingen und Erwachsenen. Unter den pathogenen *E. coli* Stämmen kommt der Gruppe der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) als Verursacher lebensbedrohender hämorrhagischer Kolitiden und des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) mit Nierenversagen und hämolytischer Anämie mit Thrombozytopenie besondere Bedeutung zu (1, 2, 3). Diese Stämme wie *E. coli* O:157; O:26; O:111 und andere Serovare bilden Zytotoxine (Shiga Toxin 1 und 2, Shiga Toxin Varianten), die einen zytopathischen Effekt auf Verozellen haben, was zur Namensgebung als Verotoxin 1 und 2 führte. Methoden zum Nachweis der Enterotoxinbildung sind wie der Zytotoxizitätstest auf Verozellen und anschließendem Neutralisationstest sehr zeitaufwendig oder wie die Diagnostik mit Gensonden und Genamplifikation durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) spezialisierten Laboratorien vorbehalten. Enzymimmunologische Methoden ermöglichen einen schnellen und spezifischen Verotoxin 1- und Verotoxin 2-Nachweis in Stuhlproben, wobei dem Verotoxin-Nachweis eine Anreicherungskultur vorausgehen sollte (4, 5, 6).

Literatur:

1. Beutin, L.: Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundheitsbl. 39, 11 (1996):426-429
2. Bockemühl, J., Karch, H. und Tschäpe, H.: Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. Bundesgesundheitsbl. 6 (1997): 194-197
3. Stock, I. und Wiedemann, B.: Infektionen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli*-(EHEC-) Stämme. MMP, 20. Jahrgang, Heft 3 (1997): 58-65
4. Gerritzen, A.: Vergleichender Verotoxin-Nachweis im Stuhl mit zwei Enzymimmunoassays und dem Zytotoxizitätstest auf Verozellen. Lab. Med. 1998; 22 (12): 704-712
5. Reissbrodt, R.: Enterohämorrhagic *Escherichia coli*: isolation and identification. Biotest Bulletin 6: 65-74 (1998)
6. Fruth, A. et al.: Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz 4, 310-317 (2000)

Anwendungsbereich

Der *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum direkten Nachweis von Verotoxin 1 und 2 (Shiga Toxin 1 und 2) in Stuhlproben bzw. Stuhlkulturüberständen.

Testprinzip

Der *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 ist ein indirekter Zwei-Seiten-Assay auf der Basis polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen Verotoxin 1 (VT1) und 2 (VT2). Verdünnte unbehandelte Stuhlproben bzw. Kulturüberstände von Stuhlproben sowie negative und positive Kontrollproben werden in die mit polyklonalen anti-VT1- und anti-VT2-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) werden die ungebundenen Komponenten durch einen Waschschrift entfernt und biotinylierte, monoklonale anti-VT1- und anti-VT2-Antikörper in die Kavitäten dispensiert. Nach erneuter Inkubation für 30 min bei RT werden die ungebundenen biotinylierten Antikörper in einem Waschschrift entfernt. Die gebundenen biotinylierten Antikörper reagieren in einem weiteren Inkubationsschritt (30 min, RT) mit Streptavidin-poly-Peroxidase (POD)-Konjugat. Nach erneutem Waschen setzt die POD im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung in ein blaues Endprodukt um. Diese Reaktion wird nach 15 min Inkubation durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die bei 450 / \geq 620 nm gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Toxin-Antigene direkt proportional.

Testkomponenten

			Für 96 Kavitäten	Für 2x 96 Kavitäten
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit polyklonalen anti-VT1 und anti-VT2- Antikörpern (Schaf)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung orange vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung orange 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 für <i>Serazym</i> [®] Verotoxin 1+2	100 ml · gebrauchsfertig orange gefärbt schwarze Kappe	2x 100 ml · gebrauchsfertig orange gefärbt schwarze Kappe
4	CONTROL +	Positive Kontrolle inaktivierter, Verotoxin positiver E. coli Kulturüberstand	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe	4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL -	Negative Kontrolle Verotoxin 1 und 2 negative Probe	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe	4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6/1	CONJ BIOTIN	Biotin-Konjugat Biotinylierte, monoklonale anti-VT1 und anti-VT2-Antikörper (Maus)	15 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt weiße Kappe	30 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt weiße Kappe
6/2	CONJ STREPT	Streptavidin-poly-POD-Konjugat	15 ml · gebrauchsfertig rot gefärbt braune Kappe	30 ml · gebrauchsfertig rot 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. Beim direkten Nachweis von Verotoxin aus dem Stuhl ist die sofortige Untersuchung nach Ankunft im Labor zu bevorzugen. Stuhlproben für die Kultur innerhalb von ein bis zwei Stunden nach Ankunft im Labor in Kulturmedium überführen oder für einen späteren Ansatz sofort bei -20°C aufbewahren. Bouillonproben, die im *Serazym*[®] Verdünnungsmedium verdünnt wurden, können bis zu 24 h bei 2...8°C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

Das wiederholte Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

Vorbereitung und Verwendung

Probenansatz bei direktem Einsatz der Stuhlproben. Eingefrorene Stuhlproben zügig auftauen und gut durchmischen. In ein Reaktionsgefäß 0,5 ml Verdünnungsmedium für *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 pipettieren. Bei festen Stuhlproben 200 mg (Durchmesser etwa 4 – 6 mm) mit einem Einmalstäbchen, bei flüssigen Stuhlproben 200 µl in das Probenverdünnungsmedium überführen und sorgfältig suspendieren. Wegen möglicher inhomogener Verotoxin Antigen-Verteilung wird die Probenahme von zwei differenten Stellen eines Stuhlganges empfohlen.

Achtung: der direkte Einsatz von Stuhlproben im ELISA ohne vorherige Anreicherung kann nur als Vorscreening zum Erhalt eines schnellen ersten Ergebnisses gelten. Eine anschließende Untersuchung der entsprechenden Probe nach Voranreicherung sollte dann in jedem Fall zusätzlich erfolgen, um eine ausreichend hohe Sensitivität zu erhalten.

Ein negatives ELISA Ergebnis bei Einsatz einer nicht vorangereicherten Stuhlprobe schließt aufgrund der geringeren Sensitivität eine EHEC-Infektion nicht aus!

Probenansatz nach Anreicherung in einem Kulturmedium. Etwa 200 mg oder 200 µl der zu untersuchenden Stuhlprobe in 4 ml Anreicherungsbouillon, wie z. B. EHEC-Direktmedium (Haipha) oder mTSB (Mast) mit 50 ng/ml Mitomycin C überführen und möglichst unter Schütteln 18 – 20 h bei 37°C inkubieren. Anschließend die festen Bestandteile sedimentieren lassen oder gegebenenfalls in einer Mikrozentrifuge eine Minute bei maximaler Drehzahl zentrifugieren. Der Kulturüberstand wird 1 : 2 verdünnt im ELISA getestet (100 µl / Vertiefung).

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 · Anreicherungsmedium z.B. EHEC-Direktmedium (Haipha) oder m-TSB (Mast) mit 50 ng / ml Mitomycin C

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 Lagerung 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

Stuhlproben mit Verdünnungsmedium für *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 (3) 1 + 2,5 verdünnen, z.B. 200 mg oder 200 µl Stuhlprobe + 0,5 ml Verdünnungsmedium (3) bzw. 200 mg Stuhlprobe in 4 ml Anreicherungsbouillon (z.B. EHEC-Direktmedium, oder mTSB mit 50 ng / ml Mitomycin C) für 18 – 20 Stunden bei 37°C möglichst unter Schütteln bebrüten, Überstand (gegebenenfalls nach Zentrifugation) 1 : 2 in Verdünnungsmedium verdünnen und 100 µl pro Vertiefung im ELISA einsetzen. 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

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je 120 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
 120 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
 100 µl **verdünnte Probe** bzw. **verdünnten Kulturüberstand** pipettieren.
3. Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
4. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 3 Tropfen (oder 120 µl) **CONJ BIOTIN** Biotin-Konjugat (6/1) pro Kavität.
6. Platte abkleben und 30 min bei RT inkubieren.
7. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 3 Tropfen (oder 120 µl) **CONJ STREPT** Streptavidin-poly-POD-Konjugat (6/2) pro Kavität.
9. Platte abkleben und 30 min bei RT inkubieren.
10. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
11. 3 Tropfen (oder 120 µl) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
12. 15 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
13. 3 Tropfen (oder 120 µl) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
14. 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 + 0,20

Proben mit OD-Werten gleich oder höher als die des errechneten Grenzwertes sind als positiv, Proben mit OD-Werten unterhalb des errechneten Grenzwertes sind als negativ im *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 zu bewerten.

Referenzwert

<i>Serazym</i> [®] Verotoxin 1+2	
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 Nachweis von VT 1 und VT 2 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.

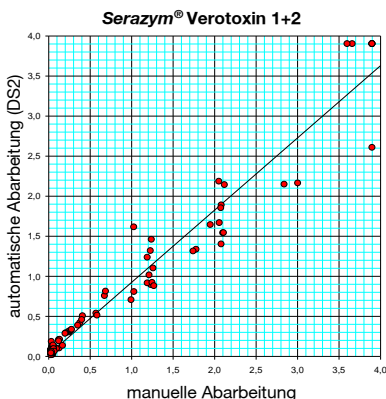
Ein negatives Ergebnis im Verotoxin 1+2 ELISA schließt eine Infektion nicht aus: Da der Toxingehalt der zu untersuchenden Stuhlproben häufig sehr niedrig ist, hat die selektive Anreicherung der VT produzierenden Erreger in einem dafür geeigneten Medium entscheidenden Einfluss auf die Sensitivität des Nachweises im ELISA. Die Gesamtinterpretation des ELISA-Testergebnisses sollte im Zusammenhang mit dem Erregernachweis und der Klinik erfolgen.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 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

Bei der parallelen Untersuchung von 188 Proben in manueller und automatischer Abarbeitung (DS2, Dynex Technologies) konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,98 ermittelt werden.



Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizienten (VK) im *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 aus 12-fach Bestimmungen von Proben:

VT 2 (pg/ml)	OD-Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
3125	2,268	0,051	2,3
800	0,799	0,037	4,7
200	0,262	0,013	5,1
0	0,056	0,006	11,3

Inter-Assay Variationskoeffizienten (VK) im *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 in 11 unterschiedlichen Testläufen aus 3-fach Bestimmungen von Proben:

VT 2 (pg/ml)	OD-Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
3125	2,026	0,057	2,8
800	0,752	0,055	7,3
200	0,241	0,022	9,3
0	0,048	0,007	15,1

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze wurde für VT 1 und VT 2 durch getrennte Titration der gereinigten Toxine im ELISA mit < 100 pg/ml bestimmt.

Klinische Erprobung

Im Rahmen einer Studie wurden insgesamt 825 Stuhlproben parallel im *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 sowie im Verozellzytotoxizitätstest untersucht. Dabei handelte es sich um 795 auf pathogene Darmerreger zu untersuchende Stuhlproben und 30 durch Shiga-Toxin-Gen-PCR und Kultur vorcharakterisierte und bis zur Testung bei -20°C gelagerte Stuhlproben. Die Testung im ELISA erfolgte nach Voranreicherung der Proben (mTSB; 18 – 20 Stunden bei 37°C).

		Zytotoxizitätstest	
		positiv	negativ
<i>Serazym</i> [®] ELISA	positiv	0	2
	negativ	0	793

Spezifität: 98,8%

		Zytotoxizitätstest	
		positiv	negativ
<i>Serazym</i> [®] ELISA	positiv	11	0
	negativ	2	17

Sensitivität: 84,6%

Kreuzreaktivität

Die mikrobiologische Routinediagnostik der im Rahmen der klinischen Studie untersuchten Stuhlproben ergab bei 141 Proben einen positiven Erregernachweis. Diese Erreger konnten insgesamt 12 verschiedenen Bakterien-Spezies zugeordnet werden (*Staphylococcus aureus*, Enterotoxin positive und negative Stämme; *Clostridium difficile*, Toxin positive Stämme; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella typhimurium*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec.*; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas caviae*; *Campylobacter spec.*; *Hafnia alvei*; *Yersinia enterocolitica* O:3). Keiner dieser Erreger verursachte falsch positive Ergebnisse im *Serazym*[®] Verotoxin 1+2.

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 kann NICHT Parameter-übergreifend eingesetzt werden!

Der Waschpuffer, die TMB/Substratlösung und Stopplösung kann darüber hinaus Parameter-übergreifend 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), 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 Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller zur Komplettierung eines geöffneten Testbestecks 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 potenziell 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® Verotoxin 1+2 (E-030)

- | | | | | |
|----|---|----------------------------|--|---|
| 1. |  | 120 µl
120 µl
100 µl | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL +</div> (4)
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL -</div> (5) | verdünnte Stuhlkulturprobe pipettieren

60 min Inkubation (Raumtemperatur)
5 x Waschen mit Waschlösung |
| |  | | | |
| 2. |  | 3 Tropfen (oder 120 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONJ BIOTIN</div> (6/1) | 30 min Inkubation (Raumtemperatur)
5 x Waschen mit Waschlösung |
| |  | | | |
| 3. |  | 3 Tropfen (oder 120 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONJ STREPT</div> (6/2) | 30 min Inkubation (Raumtemperatur)
5 x Waschen mit Waschlösung |
| |  | | | |
| 4. |  | 3 Tropfen (oder 120 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">SUBSTR TMB</div> (7) | 15 min Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur) |
| 5. |  | 3 Tropfen (oder 120 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">STOP</div> (8) | |

Messung der OD bei 450 / ≥ 620 nm

 Hersteller	 Herstellungsdatum	 Verwendbar bis	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">LOT</div> Charge	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">REF</div> Artikelnummer
 Vor Sonnenlicht schützen	 Temperaturbegrenzung	 Biologische Risiken	 Nicht wiederverwendbar	
 Gebrauchsanweisung beachten	 Achtung	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">IVD</div> In-vitro-Diagnostikum	 Ausreichend für <n> Prüfungen	

Serazym[®] Verotoxin 1+2

Enzyme immunoassay for detection of Verotoxin 1+2 (Shiga-Toxin 1+2) in stool specimens

REF E-030 ▽ 96 REF E-030-A2 ▽ 2x 96 IVD *In-vitro*-diagnostic medical device CE



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

Introduction

Invasive and toxigenic *Escherichia coli* strains cause diarrhoea in infants and adults. Among pathogenic *E. coli* strains the group of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) can cause lifethreatening haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome (HUS) leading to acute renal failure and haemolytic anaemia with thrombocytopenia (1, 2, 3). Strains like *E. coli* O:157; O:26; O:111 and other serovars are characterized by the production of cytotoxins (verotoxin 1 and 2 or shiga-toxin 1 and 2, shiga-toxin variants). The diagnosis of an EHEC infection is initially done by detection of the shiga-toxins. Diagnostic methods can be direct toxin detection by cytotoxicity test on vero-cells and subsequent neutralization test or the detection of the encoding genes with probes or polymerase chain reaction (PCR). These methods are time-consuming and not suited for a routine diagnostic laboratory. Immunological methods like enzyme immunoassay enable a fast and specific shiga-toxin detection in stool specimens. It is commonly recommended to enrich the EHEC bacteria in selective broth media prior to the test run to enhance the sensitivity of the method (4, 5, 6).

References:

1. Beutin, L.: Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundheitsbl. 39, 11 (1996):426-429
2. Bockemühl, J., Karch, H. und Tschäpe, H.: Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. Bundesgesundheitsbl. 6 (1997): 194-197
3. Stock, I. und Wiedemann, B.: Infektionen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli*-(EHEC-) Stämme. MMP, 20. Jahrgang, Heft 3 (1997): 58-65
4. Gerritzen, A.: Vergleichender Verotoxin-Nachweis im Stuhl mit zwei Enzymimmunoassays und dem Zytotoxizitätstest auf Verozellen. Lab. Med. 1998; 22 (12): 704-712
5. Reissbrodt, R.: Enterohämorrhagic *Escherichia coli*: isolation and identification. Biotest Bulletin 6: 65-74 (1998)
6. Fruth, A. et al.: Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz 4, 310-317 (2000)

Intended Use

The **Serazym® Verotoxin 1+2** is an *in-vitro*-diagnostic medical device for direct detection of Verotoxin 1 and 2 (shiga-toxin 1 and 2) in faecal specimens and stool culture supernatants.

Principle Of The Test

Serazym® Verotoxin 1+2 is an indirect two-site-immunoassay for the qualitative determination of verotoxin 1 and 2 based on polyclonal and monoclonal antibodies. Verotoxin 1 and/or 2 of specimens and the positive control react with polyclonal anti-verotoxin 1 and 2 antibodies coated on the solid phase of the microplate. After incubation for 60 minutes at room temperature (RT) non-bound material is removed by a washing step. Subsequently bound toxins specifically react with biotinylated monoclonal anti-verotoxin 1 and anti-verotoxin 2 antibodies during a second incubation period of 30 min at RT. Non-bound material is separated from the solid-phase immune complexes by a subsequent washing step. During the next incubation period of 30 min at RT horseradish peroxidase (HRP) conjugated streptavidin reacts with the bound biotinylated antibodies. Unbound conjugate is removed by a washing step. HRP converts the subsequently added colourless substrate solution of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells after 15 min incubation at RT 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 verotoxin 1 and/or verotoxin 2. 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-Verotoxin 1+2 antibodies (sheep)	12 single breakable 8-well strips colour coding orange vacuum-sealed with desiccant	2x 12 single breakable 8-well strips colour coding orange 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 for <i>Serazym</i> [®] Verotoxin 1+2	100 ml · ready to use coloured orange black cap	2x 100 ml · ready to use coloured orange black cap
4	CONTROL +	Positive control Inactivated Verotoxin positive culture supernatant	2.0 ml · ready to use coloured blue red cap	4.0 ml · ready to use coloured blue red cap
5	CONTROL -	Negative control Verotoxin negative sample	2.0 ml · ready to use coloured blue green cap	4.0 ml · ready to use coloured blue green cap
6/1	CONJ BIOTIN	Biotin-conjugate Biotinylated, monoclonal anti-Verotoxin 1 and 2 antibodies (mouse)	15 ml · ready to use coloured green white cap	30 ml · ready to use coloured green white cap
6/2	CONJ STREPT	Streptavidin-poly-HRP-conjugate	15 ml · ready to use coloured red brown cap	30 ml · ready to use coloured red 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 (36...46°F) immediately after collection and processed within 72 hours. Longer storage is possible at least at -20°C (-4°F). In case of direct verotoxin detection from stool suspension in sample diluent, testing immediately after the sample has arrived in the laboratory should be preferred. Stool specimens for enrichment culture should be transferred to the enrichment broth within 1 - 2 hours after the sample has arrived. Samples from broth cultures already diluted with the *Serazym*[®] sample diluent can be stored for up to 24 h at 2...8°C before testing in the ELISA.

Preparation

Sample preparation for direct testing from diluted stool specimens

Quickly thaw frozen stool specimens and mix them well. Samples treated with transport media should also be mixed before testing. Pipette 500 µl of *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 sample diluent into a clean tube. Transfer 200 mg (diameter about 4 - 6 mm) or 200 µl stool sample into the tube with the 500 µl of *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 sample diluent and mix thoroughly.

Caution: the direct investigation of stool specimens with ELISA without prior enrichment should only serve as screening method for a fast preliminary result. A subsequent additional investigation of the

concerning sample after enrichment is absolutely necessary to reach a sufficient sensitivity. **A negative ELISA result does not necessarily exclude an infection with EHEC when stool samples are tested without enrichment culture.**

Sample preparation for testing from enrichment culture

Transfer about 200 mg or 200 µl of stool sample into a tube with 4 ml enrichment broth, e.g. EHEC-Direktmedium (Haipha) or mTSB (Mast) containing 50 ng/ml Mitomycin C and incubate for 18 to 20 hours at 37°C (98°F). If possible, use a shaker during sample incubation. Subsequently allow floating particles to sediment or if necessary, sediment floating particles by a centrifugation step. Dilute the culture supernatant 1 : 2 with *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 sample diluent and dispense 100 µl diluted culture sample per well.

Materials Required But Not Provided

Adjustable one-channel micropipettes and pipette tips · adjustable multi-channel pipette or multi-pipette and pipette tips · Reagent container for multi-channel pipette · 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer · microplate reader with 450 nm filter for measurement and ≥ 620 nm for reference · distilled or deionized water · glassware · tubes (2 ml) for sample preparation · enrichment broth, e. g. EHEC-Direktmedium (Haipha) or mTSB (Mast) containing 50 ng/ml Mitomycin C

Preparation And Storage Of Reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1x 96 or 2x 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 (36...46°F), 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 1 month when stored at 2...8°C (36...46°F).

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

Dilute stool samples with *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 sample diluent (3) 1 + 2.5, e.g. 200 mg or 200 µl stool + 0.5 ml *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 sample diluent (3).

For enrichment culture: Transfer 200 mg or 200 µl stool sample to 4 ml enrichment broth (e.g. EHEC-Direktmedium or mTSB + 50 ng/ml Mitomycin C) and incubate for 18 – 20 hours at 37°C (98°F) if possible on a shaker. Dilute culture supernatant 1:2 with *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 sample diluent (3), mix thoroughly and use 100 µl / well for ELISA testing.

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 the remaining fluid is completely drained in every single wash cycle!

Avoid light exposure of the TMB substrate solution!

Working steps

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Pipette: 120 µl **CONTROL +** positive control (4)
120 µl **CONTROL -** negative control (5)
100 µl **diluted stool specimen** or **diluted culture supernatant**.
3. Cover plate and incubate for 60 min at RT.
4. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
5. Dispense 3 drops (or 120 µl) **CONJ BIOTIN** biotin-conjugate (6/1) per well.
6. Cover plate and incubate for 30 min at RT.
7. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
8. Dispense 3 drops (or 120 µl) **CONJ STREPT** streptavidin-poly-HRP-conjugate (6/2) per well.
9. Cover plate and incubate for 30 min at RT.
10. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
11. Dispense 3 drops (or 120 µl) **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
12. Incubate for 15 min at RT protected from light.
13. Dispense 3 drops (or 120 µl) **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
14. 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 + 0.20

Samples with OD values equal with or higher than the cut-off are considered positive, samples with OD values below the cut-off are considered negative in the *Serazym*[®] Verotoxin 1+2.

Reference Values

<i>Serazym</i>[®] Verotoxin 1+2	
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 ≤ 0.20 (manual performance)
 ≤ 0.30 (automatic performance)
- the mean OD of the positive control is ≥ 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

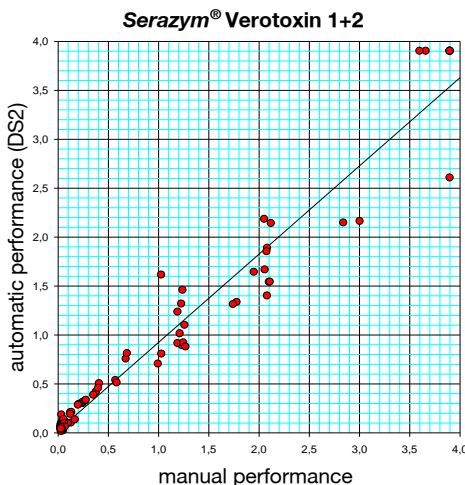
There is no correlation between measured absorbance and seriousness of the infection. It is also not allowed to correlate absorbances of the samples with that of the positive control. Cross contamination of reagents and samples can produce false positive results. Incorrect dilutions, not sufficiently homogenized samples or solid particles after centrifugation of the suspension can cause false results. A negative test result in the *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 does not necessarily exclude an EHEC infection. Due to the usually low toxin concentrations in stool samples, the selective enrichment of EHEC bacteria in special culture media is of decisive influence on the sensitivity of the toxin detection with ELISA (6). The overall interpretation of the ELISA results should always consider the microbiological examination as well as clinical findings.

Automatic Processing

Performing the *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 on fully automated microplate processors (e.g. DS2, 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 188 specimens was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with $r = 0.98$.



Performance Characteristics

Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 calculated from 12-fold determinations of samples:

verotoxin 2 (pg/ml)	mean OD	standard deviation	CV (%)
3125	2.268	0.051	2.3
800	0.799	0.037	4.7
200	0.262	0.013	5.1
0	0.056	0.006	11.3

Inter-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 in 11 different test runs from 3-fold determinations of samples:

verotoxin 2 (pg/ml)	mean OD	standard deviation	CV (%)
3125	2.026	0.057	2.8
800	0.752	0.055	7.3
200	0.241	0.022	9.3
0	0.048	0.007	15.1

Lower detection limit

The lower detection limit of the *Serazym*[®] Verotoxin 1+2 was determined with < 100 pg / ml (<10 pg / well) by separate titration of verotoxin 1 and 2.

Specificity and sensitivity

A total of 825 stool specimens were tested in parallel with the vero-cell cytotoxicity assay and the *Serazym*[®] Verotoxin 1+2. The sample material consisted of 795 specimens sent for TPE-group diagnosis and 30 specimens that were already characterized by shiga-toxin gen PCR and culture and stored at -20°C (-4°F) until testing. Enrichment culture (mTSB; 18 - 20 hours at 37°C (98°F) of all samples was carried out prior to ELISA testing.

		Vero-cell assay	
		positive	negative
<i>Serazym</i> [®] ELISA	positive	0	2
	negative	0	793

Specificity: 98.8%

		Vero-cell assay	
		positive	negative
<i>Serazym</i> [®] ELISA	positive	11	0
	negative	2	17

Sensitivity: 84.6%

Cross reactivity

The routine diagnosis for TPE-group bacteria in this study revealed a positive pathogen detection in 141 samples. These pathogens belonged to 12 different bacterial species:

Staphylococcus aureus, enterotoxin negative; *Staphylococcus aureus*, enterotoxin positive; EHEC; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella typhimurium*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec.* *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas caviae*; *Campylobacter spec.*; *Hafnia alvei*; *Yersinia enterocolitica* O:3. None of them caused false positive reactions in the *Serazym*[®] Verotoxin 1+2.

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 IS NOT universally applicable!

The 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 (36...46°F) 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*[®] Verotoxin 1+2 (E-030)

1.  pipette:
 120 µl **CONTROL +** (4)
 120 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **diluted stool specimen** or **culture supernatant**
 60 min incubation (room temperature)
 5 x wash with wash solution
2.  3 drops (or 120 µl) **CONJ BIOTIN** (6/1)
 30 min incubation (room temperature)
 5 x wash with wash solution
3.  3 drops (or 120 µl) **CONJ STREPT** (6/2)
 30 min incubation (room temperature)
 5 x wash with wash solution
4.  3 drops (or 120 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 15 min incubation (room temperature) protected from light
5.  3 drops (or 120 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	

