Produkt- und Gebrauchsinformation

Serazym® Cryptosporidium parvum

Enzymimmunoassay zum Nachweis von *Cryptosporidium parvum* in Stuhlproben

REF E-039-A 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

Die Gattung Cryptosporidium zählt unter den Protozoen zum Stamm der Apicomplexa. Sie sind mit einem Komplex sekretorischer Organellen ausgerüstet, die diesen obligat intrazellulären Parasiten das Eindringen in die Wirtszelle ermöglichen. Von den als humanpathogen beschriebenen Arten gilt *Cryptosporidium parvum* als der wichtigste Auslöser einer Diarrhöe beim Menschen, aber auch bei verschiedenen Säugetierarten (Zoonose) (1, 2). Cryptosporidium wird fäkal-oral über kontaminierte Nahrung oder Trinkwasser, aber auch durch direkten Kontakt zu Infizierten übertragen. Die Infektion erfolgt über die mit dem Stuhl ausgeschiedene Dauerform, die Oocyste, aus der im Dünndarm die vegetativen, beweglichen Sporozoiten freigesetzt werden. Die Sporozoiten dringen in die Darmepithelzellen ein, wo sie sich dicht unterhalb des Mikrovillisaumes in einer parasitophoren Vakuole befinden. Sie vermehren sich dort sowohl durch Zweiteilung (asexuell) als auch sexuell. Die bei der sexuellen Vermehrung entstehenden Mikro- und Makrogamonten vereinigen sich zur infektiösen Oocyste, in der sich durch Sporulation die Sporozoiten entwickeln. Bei den Oocysten unterscheidet man sog. dünnwandige Oocysten, die innerhalb des Wirtsorganismus zur Autoinfektion der Darmepithelzellen führen, von dickwandigen Oocysten. Lediglich die dickwandigen Oocysten werden mit dem Stuhl ausgeschieden und können neue Wirte infizieren. Das klinische Bild der Cryptosporidiose äußert sich in der Regel in Form wässriger, meist selbstlimitierender Diarrhöen. Bei immunsupprimierten Patienten kann Cryptosporidium dagegen langdauernde, lebensbedrohliche Durchfallerkrankungen verursachen.

Einzelne Fälle von Infektionen des Respirationstraktes und der Gallengänge sind ebenfalls beschrieben worden (1, 2). Die Diagnostik einer Cryptosporidium Infektion erfolgt über den direkten Nachweis von Oocysten in Stuhl- bzw. Kotproben entweder mikroskopisch (Mikroskopie gefärbter Stuhlausstriche oder direkte Immunfluoreszenz) oder immunologisch (Enzymimmunoassay) oder mittels Nukleinsäureamplifikationstechniken (PCR). Die in der Routinediagnostik bevorzugt eingesetzten Enzymimmunoassays verwenden mono- oder polyklonale Antikörper gegen nicht näher charakterisierte Antigene aus dem Oocystenstadium des Parasiten (3, 4).

Literatur:

1. Current, William L. and Lynne s. Garcia (1991): Cryptosporidiosis. Clinical Microbiology Reviews Vol. 4 (3): p325-358.
2. Clark, Douglas P. (1999): New Insights into Human Cryptosporidiosis. Clinical Microbiology Reviews Vol. 12(4): p554-563.
3. Parisi, Mary T. and Philip M. Tierno, JR (1995): Evaluation of new rapid commercial enzyme immunoassay for detection of Cryptosporidium Oocysts in untreated stool specimens. Journal of Clinical Microbiology Vol. 33(7): p1963-1965.
4. Bialek, R. et al. (2002): Comparison of Fluorescence, Antigen and PCR Assays to Detect Cryptosporidium parvum in Faecal Specimens. Diagnostic Microbiology And Infectious Disease Vol. 43(4): p283-288.

Anwendungsbereich

Der *Serazym*® Cryptosporidium parvum ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum Nachweis von *Cryptosporidium parvum* in Stuhlproben.

Testprinzip

Der *Serazym*® Cryptosporidium parvum ist ein Enzymimmunoassay auf der Basis monoklonaler Antikörper gegen *Cryptosporidium parvum* spezifische Antigene. Verdünnte Stuhlproben sowie positive und negative Kontrollen reagieren im ersten Inkubationsschritt (60 min, Raumtemperatur, RT) mit den Festphase-gebundenen anti-Cryptosporidium parvum Antikörpern. Ungebundene Komponenten werden im nachfolgenden Waschzyklus entfernt. Im nächsten Inkubationsschritt (30 min, RT) erfolgt die Reaktion der Festphase-gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexe mit Peroxidase -(POD)-markierten anti-Cryptosporidium parvum Antikörpern (Konjugat). Nach erneutem Waschen setzt die POD im folgenden Reaktionsschritt die farblose Chromogen/Substratlösung in ein blaues Endprodukt um. Diese Reaktion wird nach 10 min Inkubation (lichtgeschützt bei RT) durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen. Das gelbe Endprodukt wird bei 450 / $\geq$ 620 nm photometrisch gemessen.

Testkomponenten

			Für 96 Kavitäten
1	WELLS	**Mikrotiterplatte** beschichtet mit monoklonalen anti-C. parvum Antikörpern (Maus)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung schwarz vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF CONC 10x	**Waschpuffer** 10-fach	100 ml Konzentrat für 1000 ml Lösung weiße Kappe
3	DIL	**Verdünnungsmedium**	100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe
4	CONTROL +	**Positive Kontrolle** *Cryptosporidium parvum* Oocysten, inaktiviert	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL –	**Negative Kontrolle** *Cryptosporidium parvum* negative Probe	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6	CONJ HRP	**POD-Konjugat** POD-markierte monoklonale anti-C. parvum Antikörper (Maus)	15 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt violette Kappe
7	SUBSTR TMB	**Substrat** 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe
8	STOP	**Stopplösung** 0,25 M Schwefelsäure	15 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 eingefroren bei -20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate zu vermeiden. Stuhlproben, die bereits im *Serazym*® Verdünnungsmedium entsprechend Testanleitung verdünnt wurden, können über 72 h bei 2…8°C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.
In Transportmedien (PARA-PAK PLUS, PARA PAK PLUS SAF) gelagerte Stuhlproben, können ebenfalls im *Serazym*® Cryptosporidium parvum eingesetzt werden.

Vorbereitung und Verwendung

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

Konservierte Stuhlproben:
Probe gut durchmischen und ohne weitere Verdünnung im *Serazym*® Cryptosporidium parvum einsetzen.

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

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck ist ausreichend für 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

Proben mit Verdünnungsmedium *(3)* 1:6 verdünnen, z.B. 200 mg oder 200 µl Stuhlprobe + 1,0 ml Verdünnungsmedium *(3)*.
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 100 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle *(4)*
   100 µl **CONTROL –** Negative Kontrolle *(5)*
   100 µl **verdünnte Probe** 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 100 µl) **CONJ HRP** POD- Konjugat *(6)* 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 100 µl) **SUBST TMB** Substrat *(7)* pro Kavität.
9. 10 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
10. 3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** Stopplösung *(8)* pro Kavität, kurz schütteln.
11. Messen der OD bei 450 nm / ≥ 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min.

Berechnung der Ergebnisse

Qualitative Evaluierung
Cut-off Bestimmung: OD Negative Kontrolle + 0,10
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*® Cryptosporidium parvum zu bewerten.

Referenzwerte

Serazym® Cryptosporidium parvum	
Positiv	≥ Cut-off
Negativ	< Cut-off

Aufgrund von Unterschieden in der Population wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen pathologischen und normalen 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 ≤ 0,20 (manuelle Abarbeitung)
  ≤ 0,30 (automatische Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der Positiven Kontrolle ≥ 0,80

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

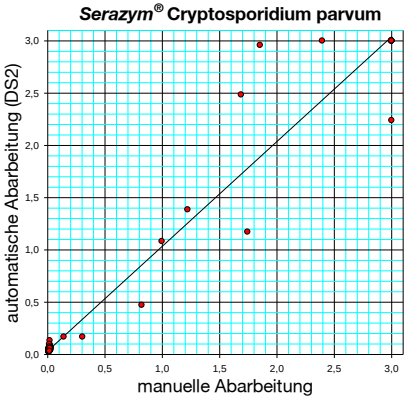
Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von *Cryptosporidium parvum* Antigen in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle in Korrelation gesetzt werden.
Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu falschen Ergebnissen führen. Unkorrekte Verdünnung, ungenügende Homogenisierung der Proben sowie nicht sedimentierte Festbestandteile können zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen.
Ein negatives Ergebnis im ELISA schließt eine Infektion mit *Cryptosporidium parvum* nicht zwingend aus. Eine inhomogene Antigenverteilung in der Probe kann zu falsch negativen Ergebnissen führen. Aus diesem Grund sollte bei negativem Testergebnis aber dringendem klinischem Verdacht eine weitere Stuhlprobe des entsprechenden Patienten untersucht werden. Die Gesamtinterpretation des Testergebnisses im ELISA sollte im Zusammenhang mit dem klinischen Bild erfolgen.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Serazym*® Cryptosporidium parvum 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 Höhe des maximal zulässigen Grenzwertes für die OD der Negativ-Kontrolle auf 0,3 zulässig. Für den Waschprozess ist die Programmierung von Waschpuffer-Einwirkzeiten (mind. 10 sec pro Streifen und Waschschritt) gefolgt von einem Waschschritt mit destilliertem oder demineralisiertem Wasser und 10 sec Einwirkzeit zu empfehlen. Gegebenenfalls kann die Anzahl der Waschschritte von 5x auf 7x bis 8x erhöht werden.

Korrelation: manuelle - automatische Abarbeitung

Bei der parallelen Untersuchung von 90 Stuhlproben in manueller und automatischer Abarbeitung (DS2, Dynex Technologies) konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,976 ermittelt werden.



Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym®* Cryptosporidium parvum aus 8-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	1,732	0,081	4,98
2	0,855	0,089	11,14
3	0,697	0,036	5,54
4	0,129	0,005	4,33

Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym®* Cryptosporidium parvum in 8 verschiedenen Testläufen aus Doppelbestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	1,704	0,066	3,89
2	0,969	0,098	10,21
3	0,519	0,023	4,45
4	0,159	0,012	7,67

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze wurde durch Titration von mit Oozysten aufgestockten Stuhlproben im *Serazym®* Cryptosporidium parvum mit 1,6 x 10^5 Oozysten pro ml Stuhlsuspension bestimmt.

Spezifität und Sensitivität

Spezifität

Ein Proben-Kollektiv von insgesamt n = 327 Stuhlproben (mikrobiologisches Routinelabor) wurde im *Serazym®* Cryptosporidium parvum untersucht:
Negativ: n = 325 · Positiv: n = 2 · Spezifität: 99,4%
Im direkten Immunfluoreszenztest wurden die beiden im ELISA positiv getesteten Proben als Cryptosporidium positiv bestätigt:
Spezifität berichtigt: 100% für das untersuchte Probenkollektiv.

Sensitivität

Cryptosporidium positiv vorcharakterisierte Stuhlproben wurden im *Serazym®* Cryptosporidium parvum im Vergleich zu zwei weiteren kommerziellen ELISAs untersucht.

n = 34	ELISA 1 positiv	ELISA 1 negativ
***Serazym®* ELISA positiv**	32	0
***Serazym®* ELISA negativ**	1*	1

Sensitivität bezogen auf ELISA 1: 96,9%
* In der im *Serazym®* ELISA negativ und im Vergleichs-ELISA 1 positiv bestimmten Probe waren im direkten Immunfluoreszenztest keine intakten Oocysten nachweisbar.

n = 19	ELISA 2 positiv	ELISA 2 negativ
***Serazym®* ELISA positiv**	18	0
***Serazym®* ELISA negativ**	0	1

Sensitivität bezogen auf ELISA 2: 100%

Kreuzreaktivität

Stuhlproben mit folgenden intestinalen Parasiten und Durchfallerregern zeigten im *Serazym®* Cryptosporidium parvum keine Kreuzreaktivität:
Adenovirus (n = 2), *Rotavirus* (n = 7), *Astrovirus* (n = 3), *Norovirus* (n = 5), *Clostridium difficile* (n = 2), *Campylobacter jejuni* (n = 2), *Helicobacter pylori* (n = 7), *Salmonella ssp.* (n = 9), *Ancylostoma duodenale* (n = 1), *Ascaris lumbricoides* (n = 2), *Blastocystis hominis* (n = 2), *Giardia lamblia* (n = 4), *Entamoeba dispar/histolytica* (n = 5).

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):

Aeromonas hydrophila	(ATCC 7966)
Bacillus cereus	(ATCC 11778)
Bacillus subtilis	(ATCC 6633)
Bacteroides fragilis	(ATCC 25285)
Candida albicans	(ATCC 10231)
Campylobacter coli	(ATCC 33559)
Campylobacter jejuni	(ATCC 33291)
Citrobacter freundii	(ATCC 8090)
Clostridium sordellii	(ATCC 9714)
Enterobacter aerogenes	(ATCC 13048)
Enterobacter cloacae	(ATCC 13047)
Enterococcus faecalis	(ATCC 29212)
Escherichia coli	(ATCC 25922)
Klebsiella pneumoniae	(ATCC 13883)

Peptostreptococcus anaerobius	(ATCC 27337)
Proteus vulgaris	(ATCC 8427)
Pseudomonas aeruginosa	(ATCC 10145)
Salmonella enterica Serovar enteritidis	(ATCC 13076)
Salmonella enterica Serovar typhimurium	(ATCC 14028)
Shigella flexneri	(ATCC 12022)
Shigella sonnei	(ATCC 25931)
Staphylococcus aureus	(ATCC 25923)
Staphylococcus epidermidis	(ATCC 12228)
Vibrio parahaemolyticus	(ATCC 17802)
Vibrio cholerae	Klinisches Isolat
Yersinia enterocolitica Serotyp 03, 09	Klinische Isolate

Interferenz

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

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 *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 Komplettierung 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!

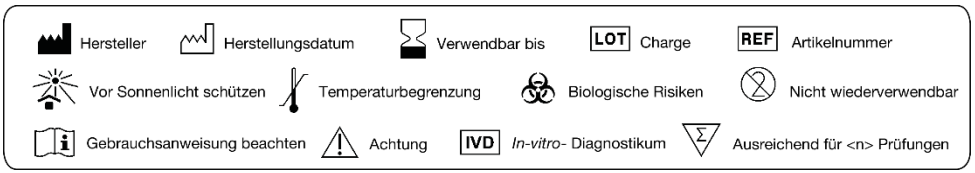
Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2021-01-26	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen, Testdurchführung, Symbolkasten	Aktualisierung
	Änderungshistorie	Einführung des Abschnittes “Änderungshistorie“

Inkubationsschema *Serazym*® Cryptosporidium parvum (E-039-A)

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

Messung der OD bei 450 / ≥ 620 nm



Serazym® Cryptosporidium parvum

Enzyme immunoassay for detection of *Cryptosporidium parvum* in faecal samples

REF E-039-A Σ 96 IVD *In-vitro*- diagnostic medical device CE

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

Introduction

The genus Cryptosporidium belongs to the phylum Apicomplexa, protozoan parasites characterized by secretory cell organells enabling the invasion of host cells. Among different human pathogenic species *Cryptosporidium parvum* represents the most important cause of diarrhea in man but also in several animal species (Zoonosis) (1, 2). The transmission of Cryptosporidium is effected by food or drinking water contaminated with faeces. Person to person transmission has also been described. After ingestion of the infective stage, the oocyst, the vegetative motile sporozoites will be released in the small intestine, where they invade into the enterocytes and stay in a parasitophorous vacuole beneath the microvilli. The sporozoites multiply by bisection (asexually) as well as sexually. In the course of sexual multiplication micro- and macrogamonts emerge and fuse to form the infective oocyst. The oocysts can be devided into thin-wall and thick-wall oocysts: the thin-wall oocysts are responsible for autoinfections within the same host whereas the thick-wall oocysts are excreted with the faeces and are therefore responsible for transmission to other hosts. The clinical picture of cryptosporidiosis is usually watery self-limiting diarrhea. However immunocompromised persons can develop prolonged and life-threatening diarrhea. In rare cases extraintestinal infections of e.g. the respiratory tract or bile-duct have been reported (1, 2). Cryptosporidium infections are usually diagnosed by direct pathogen detection from faecal specimens either by microscopy of dyed smears, immune fluorescence microscopy or by immunological methods like ELISA. Nucleic acid amplification techniques (PCR) are also established but still restricted to special laboratories. Enzyme immunoassays used for routine diagnostics are based on mono- or polyclonal antibodies directed to not further characterized antigens derived from the oocyst stage of the parasite (3, 4).

References:

1. Current, William L. and Lynne s. Garcia (1991): Cryptosporidiosis. Clinical Microbiology Reviews Vol. 4 (3): p325-358.
2. Clark, Douglas P. (1999): New Insights into Human Cryptosporidiosis. Clinical Microbiology Reviews Vol. 12(4): p554-563.
3. Parisi, Mary T. and Philip M. Tierno, JR (1995): Evaluation of new rapid commercial enzyme immunoassay for detection of Cryptosporidium Oocysts in untreated stool specimens. Journal of Clinical Microbiology Vol. 33(7): p1963-1965.
4. Bialek, R. et al. (2002): Comparison of Fluorescence, Antigen and PCR Assays to Detect Cryptosporidium parvum in Faecal Specimens. Diagnostic Microbiology And Infectious Disease Vol. 43(4): p283-288.

Intended Use

***Serazym*® Cryptosporidium parvum is an *in-vitro*-diagnostic medical device for direct detection of *Cryptosporidium parvum* in faecal samples.**

Principle Of The Test

The *Serazym*® Cryptosporidium parvum is based on monoclonal antibodies to *Cryptosporidium parvum* specific proteins. Within the first incubation step (60 min, room temperature, RT) diluted stool specimens as well as positive and negative controls react with the solid-phase adsorbed antibodies. Unbound components are removed by a subsequent washing step. Within the second incubation step (30 min, RT) solid-phase bound immune complexes react with the horseradish (HRP)-labelled antibodies of the conjugate. Unbound reagents are separated from the solid-phase antibody-antigen-antibody immune complexes by a further washing step. HRP converts the subsequently added colourless chromogenic substrate solution into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells after 10 min incubation at RT turning the solution from blue to yellow. The optical density (OD) is read at 450 / $\geq$ 620 nm with a microplate photometer.

Test Components

			For 96 Wells
1	WELLS	**Microtitration plate** coated with monoclonal anti-C. parvum antibodies (mouse)	12 single breakable 8 well strips colour coding black vacuum sealed with desiccant
2	WASHBUF CONC 10x	**Wash buffer** 10-fold	100 ml concentrate for 1000 ml solution white cap
3	DIL	**Sample diluent**	100 ml · ready to use coloured yellow black cap
4	CONTROL +	**Positive control** *Cryptosporidium parvum* Oocysts, inactivated	2.0 ml · ready to use coloured blue red cap
5	CONTROL –	**Negative control** *Cryptosporidium parvum* negative sample	2.0 ml · ready to use coloured blue green cap
6	CONJ HRP	**HRP-conjugate** HRP-labelled monoclonal anti-C.parvum antibodies (mouse)	15 ml · ready to use coloured green violet cap
7	SUBSTR TMB	**Substrate** 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	15 ml · ready to use blue cap
8	STOP	**Stop solution** 0.25 M sulphuric acid	15 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 -20°C. Repeated 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. Faecal samples that are already diluted in transportation media (PARA-PAK PLUS, PARA-PAK PLUS SAF) are also suitable in the *Serazym*® Cryptosporidium parvum.

Preparation

Untreated samples: Warm samples to room temperature and mix well. 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 200 µl if liquid into the tube and suspend thoroughly. If necessary, sediment floating particles by a centrifugation step with a micro centrifuge for one min at maximum speed.

Conserved samples, prediluted in transportation media: Mix sample thoroughly and apply 100 µl without any further dilution in the *Serazym*® Cryptosporidium parvum.

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 · microplate reader with optical filters of 450 nm for measurement and ≥ 620 nm for reference · distilled or deionized water · glassware · tubes (2 ml) for sample preparation

Preparation And Storage Of Reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 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 two 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.
Example: 10 ml wash buffer concentrate *(2)* + 90 ml distilled or deionized water.

Assay Procedure

Dilute samples with sample diluent *(3)* 1 : 6, e.g. 200 mg or 200 µl faeces + 1.0 ml sample diluent *(3)*.
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 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: 100 µl **CONTROL +** positive control *(4)*
   100 µl **CONTROL –** negative control *(5)*
   100 µl **diluted sample**.
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 100 µl) **CONJ HRP** HRP-conjugate *(6)* 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 100 µl) **SUBST TMB** substrate *(7)* per well.
9. Incubate for 10 min at RT protected from light.
10. Dispense 3 drops (or 100 µl) **STOP** stop solution *(8)* per well, mix gently.
11. Read OD at 450 nm / ≥ 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 with or higher than the cut-off are considered positive, samples with OD values below the cut-off are considered negative for *Cryptosporidium parvum* antigen.

Reference Values

Serazym® Cryptosporidium parvum	
Positive	≥ 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: ≥ 0.80

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

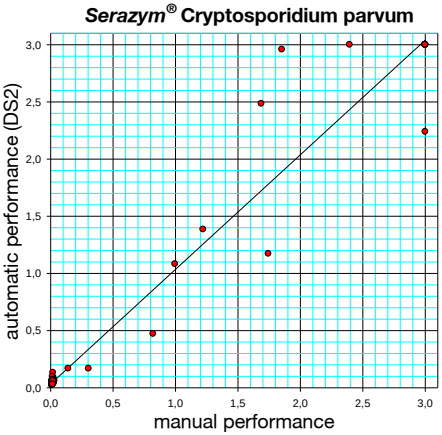
There is no correlation between measured absorbance and seriousness of the infection. It is also not allowed to correlate the absorbance of a sample with that of the positive control. Cross contamination of reagents and samples can produce false positive results. Incorrect dilutions, not sufficiently homogenized samples or solid particles after centrifugation of the diluted sample can cause false negative as well as false positive results. A negative test result not necessarily excludes a *Cryptosporidium parvum* infection. Inhomogeneous antigen distribution in the sample can cause false negative results. Therefore in case of a negative test result but clinical suspicion of an infection a further sample of the respective person should be investigated. A final interpretation of the test result should always consider clinical findings as well.

Automatic processing

Performing the *Serazym*® Cryptosporidium parvum 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 90 stool specimens was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with r = 0.976.



Reference Values

Precision

Intra-Assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*® Cryptosporidium parvum from 8-fold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	1.732	0.081	4.98
2	0.855	0.089	11.14
3	0.697	0.036	5.54
4	0.129	0.005	4.33

Inter-Assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*® Cryptosporidium parvum in 8 different test runs from twofold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	1.704	0.066	3.89
2	0.969	0.098	10.21
3	0.519	0.023	4.45
4	0.159	0.012	7.67

Lower detection limit
The lower detection limit of *Cryptosporidium parvum* antigen in the *Serazym*® Cryptosporidium parvum was determined by titration of oocysts diluted in a negative stool sample: 1.6 x 10^5 Oocysts per ml stool suspension.

Specificity and sensitivity
Specificity
A sample panel of in all n = 327 stool specimens from a routine microbiological laboratory was tested in the *Serazym*® Cryptosporidium parvum: Negative: n = 325 · Positive: n = 2 · Specificity: 99.4%
The two ELISA positive samples were confirmed true positive by direct immunofluorescence:
Specificity amended: 100% for this sample panel.

Sensitivity
Faecal samples designated Cryptosporidium positive were investigated by *Serazym*® Cryptosporidium parvum in comparison to two commercially available ELISAs.

n = 34	**ELISA 1 positive**	**ELISA 1 negative**
***Serazym*® ELISA positive**	32	0
***Serazym*® ELISA negative**	1*	1

Sensitivity compared to ELISA 1: 96.9%
* The *Serazym*® ELISA negative and ELISA 1 positive sample was negative by direct immunofluorescence test.

n = 19	**ELISA 2 positive**	**ELISA 2 negative**
***Serazym*® ELISA positive**	18	0
***Serazym*® ELISA negative**	0	1

Sensitivity compared to ELISA 2: 100%

Cross reactivity
Stool samples positive for one of the subsequent pathogens have been tested with the *Serazym*® Cryptosporidium parvum and did not show any cross reactivity:
Adenovirus (n = 2), *Rotavirus* (n = 7), *Astrovirus* (n = 3), *Norovirus* (n = 5), *Clostridium difficile* (n = 2), *Campylobacter jejuni* (n =2), *Helicobacter pylori* (n = 7), *Salmonella ssp.* (n = 9), *Ancylostoma duodenale* (n = 1), *Ascaris lumbricoides* (n = 2), *Blastocystis hominis* (n = 2), *Giardia lamblia* (n = 4), *Entamoeba dispar/histolytica* (n = 5).

Negative stool samples have been spiked with ≥ 10^8 colony forming units per ml of the following microorganisms and were tested negative with the *Serazym*® ELISA (OD 450 / 620nm < Cut-Off):

Aeromonas hydrophila	(ATCC 7966)
Bacillus cereus	(ATCC 11778)
Bacillus subtilis	(ATCC 6633)
Bacteroides fragilis	(ATCC 25285)
Candida albicans	(ATCC 10231)
Campylobacter coli	(ATCC 33559)
Campylobacter jejuni	(ATCC 33291)
Citrobacter freundii	(ATCC 8090)
Clostridium sordellii	(ATCC 9714)
Enterobacter aerogenes	(ATCC 13048)
Enterobacter cloacae	(ATCC 13047)
Enterococcus faecalis	(ATCC 29212)
Escherichia coli	(ATCC 25922)
Klebsiella pneumoniae	(ATCC 13883)

Peptostreptococcus anaerobius	(ATCC 27337)
Proteus vulgaris	(ATCC 8427)
Pseudomonas aeruginosa	(ATCC 10145)
Salmonella enterica Serovar enteritidis	(ATCC 13076)
Salmonella enterica Serovar typhimurium	(ATCC 14028)
Shigella flexneri	(ATCC 12022)
Shigella sonnei	(ATCC 25931)
Staphylococcus aureus	(ATCC 25923)
Staphylococcus epidermidis	(ATCC 12228)
Vibrio parahaemolyticus	(ATCC 17802)
Vibrio cholerae	Clinical isolate
Yersinia enterocolitica Serotyp 03, 09	Clinical isolates

Interference
None of the following substances added to positive and negative stool samples showed a significant impact on the test result:
Barium sulfate (5%), Buscopan® (2 mg/ml), Cyclamate (5%), Diclofenac (2 mg/ml), Hemoglobine human (5 mg/ml), Blood human (5%), Hylak® N (5%), Iberogast® (5%), Immodium® akut duo (0.2/12.5 mg/ml), Loperamide (0.2 mg/ml), Metronidazole (2 mg/ml), Mucin (5 mg/ml), Nexium® (2 mg/ml), Palmitic acid (20%), Pentofuryl® (2 mg/ml), Pepto-Bismol (1 mg/ml), Perenterol (2.5 mg/ml), Rennie® (8 mg/ml), Simagel® (2 mg/ml), Stearic acid (20%), Vancomycin (2 mg/ml).

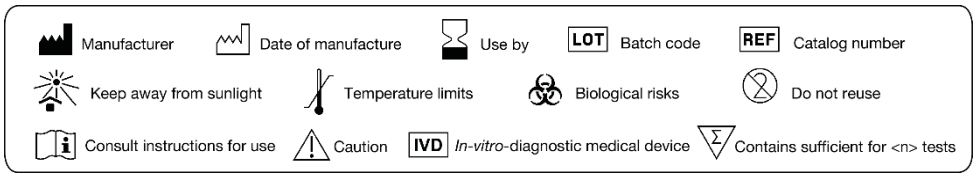
Common Advices And Precautions

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
2021-01-26	Common Advices and Precautions, symbolbox	Update
	History of Changes	Adding section “History of Changes“
	Intended use	Correction

Incubation Scheme *Serazym*® Cryptosporidium parvum (E-039-A)

1.		pipette	
		100 µl	CONTROL + *(4)*
		100 µl	CONTROL – *(5)*
		100 µl	**diluted stool sample**
		60 min	incubation (room temperature)
		5 x wash	with wash solution
2.		3 drops (or 100 µl)	CONJ HRP *(6)*
		30 min	incubation (room temperature)
		5 x wash	with wash solution
3.		3 drops (or 100 µl)	SUBSTR TMB *(7)*
		10 min	incubation (room temperature, protected from light)
4.		3 drops (or 100 µl)	STOP *(8)*
		Read OD	**at 450 / ≥ 620 nm**