

Serazym[®] Clostridium difficile Toxin A+B

Enzymimmunoassay zum Nachweis von *Clostridium difficile* Toxin A+B
in Stuhlproben und Kultursuspensionen

REF E-040 ▽ 96 REF E-040-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

Clostridium difficile gilt als der kausale Auslöser nosokomialer Diarrhoen bei Erwachsenen während oder nach einer Antibiotikabehandlung, insbesondere mit Cephalosporinen der dritten Generation (1). Obwohl 2 - 3% gesunder Erwachsener und 20 - 50% gesunder Kinder mit *Clostridium difficile* besiedelt sind, erfolgt eine Infektion in der überwiegenden Zahl der Fälle über exogene Quellen, wie z. B. Krankenhauspersonal oder durch *C. difficile* Sporen kontaminierte Gegenstände (Toiletten, Bettwäsche, etc.). Die beiden Exotoxine A und B dieses anaeroben, sporenbildenden Bakteriums verursachen die Depolymerisation von Aktin-Filamenten durch intrazelluläre enzymatische Modifikation von rho-Proteinen. Die Folge ist eine erhöhte Zellpermeabilität mit Invasion von Neutrophilen, was schließlich zur Ausprägung des klinischen Bildes der so genannten Antibiotika assoziierten Diarrhoe, der Antibiotika assoziierten Colitis (AAC) bis hin zur pseudomembranösen Colitis (PMC) führen kann (1). Aufgrund des kausalen Zusammenhangs zwischen Toxinproduktion und Erkrankung erfolgt die Diagnostik einer *Clostridium difficile* Infektion vorwiegend über den direkten Toxinnachweis aus Stuhlproben. Dabei haben immunologische Verfahren, wie z. B. Enzymimmunoassays, die beide Toxine nachweisen können, den als Goldstandard geltenden Cytotoxizitätstest inzwischen weitgehend abgelöst (2).

Literatur:

1. Rambaud J-C., LaMont J-T. (Hrsg.): "Ökosystem Darm Special - Updates on Clostridium difficile" Springer Verlag 1995
2. Wilkins T.D. and Lyerly D.M. (2003): „Clostridium difficile Testing: after 20 Years, Still Challenging“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 41, No. 2, p. 531-534

Anwendungsbereich

Der **Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B** ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum direkten Nachweis der Toxine A und B von *Clostridium difficile* in Stuhlproben und Kultursuspensionen.

Testprinzip

Der **Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B** ist ein indirekter Zwei-Seiten-Assay auf der Basis polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen die Toxine A und B von *Clostridium difficile*.

Verdünnte unbehandelte Stuhlproben oder Kultursuspensionen sowie negative und positive Kontrollproben werden, in die mit monoklonalen anti-Toxin A- und polyklonalen anti-Toxin B-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach der Inkubation werden die ungebundenen Komponenten durch einen Waschschrift entfernt und biotinylierte, polyklonale anti-Toxin A- und monoklonale anti-Toxin B-Antikörper in die Kavitäten dispensiert. Nach erneuter Inkubation werden die ungebundenen biotinylierten Antikörper in einem Waschschrift entfernt. Die gebundenen biotinylierten Antikörper reagieren in einem weiteren Inkubationsschritt mit Streptavidin-Peroxidase (POD)-Konjugat.

Nach erneutem Waschen setzt die POD im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Endprodukt um. Diese Reaktion wird nach der Inkubation durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die bei 450 nm / ≥ 620 nm gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Toxin-Antigene direkt proportional.

Testkomponenten

| | | Für 96 Kavitäten | Für 2 x 96 Kavitäten |
|-----|-------------------------|--|---|
| 1 | WELLS | Mikrotiterplatte beschichtet mit monoklonalen anti-Toxin A- (Maus) und polyklonalen anti-Toxin B-Antikörpern (Kaninchen) | 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung rot vakuumversiegelt mit Trockenbeutel |
| 2 | WASHBUF CONC 10x | Waschpuffer 10-fach | 2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung rot vakuumversiegelt mit Trockenbeutel |
| 3 | DIL | Verdünnungsmedium | 100 ml Konzentrat für 1000 ml Lösung weiße Kappe |
| 4 | CONTROL + | Positive Kontrolle <i>C. difficile</i> Toxin reaktive Probe | 100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe |
| 5 | CONTROL - | Negative Kontrolle <i>C. difficile</i> Toxin negative Probe | 2x 100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe |
| 6/1 | CONJ BIOTIN | Biotin-Konjugat Biotinylierte, polyklonale anti-Toxin A- (Kaninchen) und monoklonale anti-Toxin B-Antikörper (Maus) | 100 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe |
| 6/2 | CONJ STREPT | Streptavidin- POD-Konjugat | 4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe |
| 7 | SUBSTR TMB | Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid | 2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe |
| 8 | STOP | Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure | 4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe |

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Testansatz aus Stuhlsuspensionen

Gewinnung und Lagerung

Stuhlproben sollten sofort nach der Entnahme bei 2...8°C gelagert und innerhalb von 72 h untersucht werden, oder bei mindestens -20°C eingefroren werden. Eine Lagerung bei -20°C ist aufgrund der Gefahr des Toxinabbaus ebenso wenig zu empfehlen wie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben. Formalin behandelte Stuhlproben sollten nicht verwendet werden. Stuhlproben, die bereits im *Serazym*[®] Verdünnungsmedium entsprechend Testanleitung verdünnt wurden, können bis zu 72 h bei 2...8°C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

Vorbereitung und Verwendung

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

Testansatz aus Kultursuspensionen (toxigene Kultur)

Über 48 h auf Blut- oder CCFA-Agar gewachsene *Clostridium difficile* Kolonien können direkt im *Serazym*[®] ELISA auf Toxin A+B untersucht werden. Hierzu ist eine Bakteriensuspension herzustellen, deren Dichte Mc Farland Standard 1 entspricht (OD bei 600 nm = 0,2 bis 0,25 nach Nullabgleich gegen das gelbe *Serazym*[®] Verdünnungsmedium):

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 Mc Farland Standard 4 (OD 600 nm > 1,0 nach Nullabgleich gegen das gelbe *Serazym*[®] Verdünnungsmedium) 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 Medium-Hersteller 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.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette · 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen · 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät · Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter · destilliertes oder deionisiertes Wasser · Messzylinder · Teströhrchen (2 ml) für die Probenverdünnung · Horizontalschüttler bei Abarbeitung nach Variante 2

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

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

Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminium-beschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen. Waschpufferkonzentrat (10-fach) 1 + 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

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

Testdurchführung

Der *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B kann in zwei Varianten abgearbeitet werden:

1. Variante: Inkubation ohne Schütteln; Gesamtinkubationsdauer 2 Stunden 15 Minuten
2. Variante: Inkubation mit Schütteln; Gesamtinkubationsdauer 1 Stunde 15 Minuten

Stuhlproben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 6 verdünnen, z.B. 200 mg Stuhlprobe + 1,0 ml Verdünnungsmedium (3), bzw. 2 - 4 Impfösen einer *C. difficile* Kultur in 1,0 ml Verdünnungsmedium (3) resuspendieren.

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

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

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Arbeitsschritte Variante 1 (ohne Schütteln)

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und 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 Stuhlprobe oder Kultursuspension** 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-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.

Arbeitsschritte Variante 2 (mit Schütteln)

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 Stuhlprobe oder Kultursuspension** pipettieren.
3. Platte abkleben und 30 Minuten bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 - 700/min 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 15 Minuten bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 - 700/min 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-POD-Konjugat (6/2) pro Kavität.
9. Platte abkleben und 15 Minuten bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 - 700/min 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 (nicht schütteln).
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, die über der errechneten Grenzwert OD liegen, sind als reaktiv, Proben mit einer OD, die mehr als 10 % unter der errechneten Grenzwert-OD liegen, sind als nicht reaktiv zu bewerten. Proben mit OD, die innerhalb von 10 % unterhalb der errechneten Grenzwert-OD liegen, sind als grenzwertig zu beurteilen und müssen wiederholt getestet werden. Gegebenenfalls ist eine zweite Stuhlprobe der entsprechenden Patienten anzufordern.

Referenzwert

| Serazym® C. difficile Toxin A+B | |
|--|-------------------------|
| Positiv | > Cut-off |
| Grenzwertig | 0,9 x Cut-off – Cut-off |
| Negativ | < 0,9 x Cut-off |

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

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

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

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

Grenzen der Methode

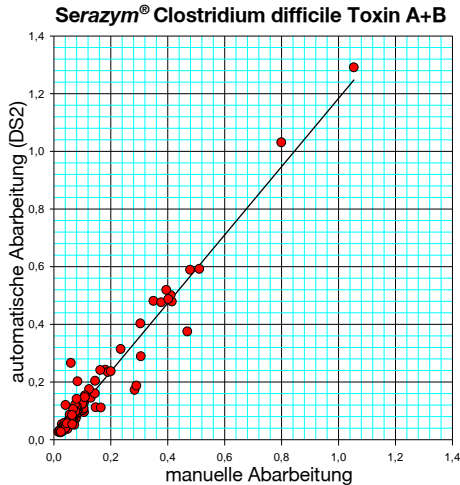
Der qualitative enzymimmunologische Nachweis der Toxine A und B von *Clostridium difficile* in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle in Korrelation gesetzt werden. Kreuzkontaminationen 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. Die Gesamtinterpretation des ELISA-Testergebnisses sollte im Zusammenhang mit dem Erregernachweis und der Klinik erfolgen.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B 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 125 Stuhlproben in manueller und automatischer Abarbeitung (DS2, Dynex Technologies) konnte ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,976$ ermittelt werden.



Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B* aus 8-fach Bestimmungen von Proben:

| Probe | OD-Mittelwert | Standardabweichung | VK (%) |
|-------|---------------|--------------------|--------|
| 1 | 1,386 | 0,042 | 3,0 |
| 2 | 0,506 | 0,017 | 3,3 |
| 3 | 0,332 | 0,028 | 8,5 |

Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B* in 5 unterschiedlichen Testläufen an zwei Tagen aus 8-fach Bestimmungen von Proben:

| Probe | OD-Mittelwert | Standardabweichung | VK (%) |
|-------|---------------|--------------------|--------|
| 1 | 1,321 | 0,102 | 7,7 |
| 2 | 0,485 | 0,034 | 6,9 |
| 3 | 0,345 | 0,037 | 10,8 |

Spezifität und Sensitivität

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

| | Vergleichs ELISA positiv | Vergleichs ELISA negativ |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Serazym® ELISA positiv</i> | 103 | 4 |
| <i>Serazym® ELISA negativ</i> | 2 | 45 |

Spezifität: 91,8% · Sensitivität: 98,0%

Kreuzreaktivität

Die Untersuchung von Stuhlproben mit einem positiven Erregernachweis der folgenden Bakterien-Spezies ergab keine falsch positiven Ergebnisse im *Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B*: *Staphylococcus aureus*, nicht Enterotoxin bildend; *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin bildend; EHEC; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella typhimurium*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec.*; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas caviae*; *Campylobacter spec.*; *Hafnia alvei*; *Yersinia enterocolitica* O:3.

Negative Stuhlsuspensionen wurden mit folgenden Mikroorganismen mit einer Keimzahl von $\geq 10^8$ Kolonie bildenden Einheiten pro ml aufgestockt und im *Serazym® ELISA* negativ getestet (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

| | |
|-------------------------------|--------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | (ATCC 7966) |
| <i>Bacillus cereus</i> | (ATCC 11778) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | (ATCC 6633) |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | (ATCC 25285) |
| <i>Candida albicans</i> | (ATCC 10231) |
| <i>Campylobacter coli</i> | (ATCC 33559) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | (ATCC 33291) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | (ATCC 8090) |
| <i>Clostridium sordellii</i> | (ATCC 9714) |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | (ATCC 13048) |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | (ATCC 13047) |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | (ATCC 29212) |

| | |
|---|--------------|
| <i>Escherichia coli</i> | (ATCC 25922) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | (ATCC 13883) |
| <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> | (ATCC 27337) |
| <i>Proteus vulgaris</i> | (ATCC 8427) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | (ATCC 10145) |
| <i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>enteritidis</i> | (ATCC 13076) |
| <i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i> | (ATCC 14028) |
| <i>Shigella flexneri</i> | (ATCC 12022) |
| <i>Shigella sonnei</i> | (ATCC 25931) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | (ATCC 25923) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | (ATCC 12228) |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | (ATCC 17802) |

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.

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 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 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 |
|------------|--|--|
| 2020-07-21 | Testkomponenten | Korrektur |
| | Vorbereitung und Lagerung der Proben | Aktualisierung |
| | Testdurchführung | Aktualisierung |
| | Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen | Aktualisierung |
| | Änderungshistorie | Einführung des Abschnittes "Änderungshistorie" |

Inkubationsschema *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B (E-040)

1.  100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **verdünnte Stuhlprobe** bzw. **Kultursuspension** pipettieren
 60 min Inkubation (RT) **alternativ: 30 min unter Schütteln**
 5 x Waschen mit Waschlösung
2.  3 Tropfen (oder 120 µl) **CONJ BIOTIN** (6/1)
 30 min Inkubation (RT) **alternativ: 15 min unter Schütteln**
 5 x Waschen mit Waschlösung
3.  3 Tropfen (oder 120 µl) **CONJ STREPT** (6/2)
 30 min Inkubation (RT) **alternativ: 15 min unter Schütteln**
 5 x Waschen mit Waschlösung
4.  3 Tropfen (oder 120 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 15 min Inkubation (lichtgeschützt bei RT) ohne Schütteln
5.  3 Tropfen (oder 120 µl) **STOP** (8)

Messung der OD bei 450 / \geq 620 nm



Hersteller



Herstellungsdatum



Verwendbar bis



Charge



Artikelnummer



Vor Sonnenlicht schützen



Temperaturbegrenzung



Biologische Risiken



Nicht wiederverwendbar



Gebrauchsanweisung beachten



Achtung



In-vitro-Diagnostikum



Ausreichend für <n> Prüfungen

Serazym[®] Clostridium difficile Toxin A+B

Enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* Toxin A and B
in stool specimens and culture suspensions

REF E-040 ▽ 96 REF E-040-A2 ▽ 2x 96 IVD *In-vitro*-diagnostic medical device CE



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

Introduction

Clostridium difficile is a bacterium causing nosocomial diarrhea in adults during or after the treatment with antibiotics such as 3rd generation cephalosporines (1). Although 2 - 3% of healthy adults and 20 - 50% of healthy children are colonized with *Clostridium difficile*, the infection is usually of exogenous origin and results from the contact either to hospital staff or to *Clostridium difficile* spores which may contaminate toilets, bed clothes etc. Both exotoxins A and B of this spore-forming bacteria cause the depolymerisation of actin filaments due to the intracellular enzymatic modification of rho-proteins. Consequently, the permeability of cell membrane is raised and neutrophils may invade leading to expression of the clinical picture of the so-called *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis or finally the pseudomembraneous colitis (PMC) (1). As the production of toxins and the outbreak of disease is correlated, diagnosis of *Clostridium difficile* infection is based mainly on a direct detection of the toxins in stool specimens. To date the cytotoxicity test has been considered as the gold standard for detection of *Clostridium difficile* toxins. Recently it has been replaced to a large extent by immunological tests such as enzyme immunoassay (2).

References:

1. Rambaud J-C., LaMont J-T. (Hrsg.): "Ökosystem Darm Special - Updates on *Clostridium difficile*" Springer Verlag 1995
2. Wilkins T.D. and Lyster D.M. (2003): „*Clostridium difficile* Testing: after 20 Years, Still Challenging“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 41, No. 2, p. 531-534

Intended Use

The *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B is an *in-vitro*-diagnostic medical device for direct detection of the toxins A and B of *Clostridium difficile* in stool specimens and culture suspensions.

Principle of The Test

Serazym[®] Clostridium difficile Toxin A + B is an indirect two-site-immunoassay for the qualitative determination of both *Clostridium difficile* toxins A and B based on polyclonal and monoclonal antibodies. *Clostridium difficile* toxins of stool specimens or culture suspensions and the positive control react with monoclonal anti-toxin A and polyclonal anti-toxin B antibodies coated on the solid phase of the microplate. After incubation non-bound material is removed by a washing step. Subsequently bound toxins specifically react with biotinylated polyclonal anti-toxin A and monoclonal anti-toxin B antibodies during a second incubation period. Non-bound material is separated from the solid-phase immune complexes by a subsequent washing step. During the next incubation period 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 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 *Clostridium difficile* toxin A and B. After consideration of 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 monoclonal anti-Toxin A- (mouse) and polyclonal anti-Toxin B-antibodies (rabbit) | 12 single breakable 8-well strips colour coding red vacuum-sealed with desiccant | 2x 12 single breakable 8-well strips colour coding red vacuum-sealed with desiccant |
| 2 | WASHBUF CONC 10x | Wash buffer 10-fold | 100 ml concentrate for 1000 ml solution white cap | 2x 100 ml concentrate for 2x 1000 ml solution white cap |
| 3 | DIL | Sample diluent | 100 ml · ready to use coloured yellow black cap | 2x 100 ml · ready to use coloured yellow black cap |
| 4 | CONTROL + | Positive control <i>C. difficile</i> Toxin reactive sample | 2.0 ml · ready to use coloured blue red cap | 4.0 ml · ready to use coloured blue red cap |
| 5 | CONTROL - | Negative control <i>C. difficile</i> Toxin 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, polyclonal anti-Toxin A- (rabbit) and monoclonal anti-Toxin B-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-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

Toxin detection from stool specimens

Collection and storage

Stool samples should be stored at 2...8°C immediately after collection and processed within 72 hours or frozen at at least -20°C. Storage at -20°C as well as repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Formalin-preserved stool samples should not be used in this assay. Stool samples already diluted with the *Serazym*[®] sample diluent can be stored for up to 72 h at 2...8°C before testing in the ELISA.

Preparation

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

Toxin detection from culture suspensions (toxigenic culture)

Colonies of *Clostridium difficile* grown on blood or CCFA agar for 48 hours can be tested directly in the *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B. Prepare a bacterial suspension according to Mc Farland standard 1 (OD value at 600 nm: 0.20 - 0.25 after zero compensation to the yellow coloured *Serazym*[®] sample diluent):

Pipette 1000 µl of sample diluent into a clean tube.

Transfer 2 - 4 inoculating loops of a *C. difficile* culture into the sample diluent and suspend on a vortex mixer. Read OD value at 600 nm as described above where required.

Use 100 µl for ELISA testing. If selective culture media are used the detectable amount of toxins may be reduced due to inhibitory components of such media resulting in decreased OD values in the ELISA. Therefore using selective media for toxigenic culture requires the preparation of a bacterial suspension at least according to Mc Farland standard 4 (OD 600 nm > 1.0 after zero compensation to the yellow coloured *Serazym*[®] sample diluent). In this case the *Clostridium difficile* colonies of at least half of a densely grown agar plate have to be harvested. Where required the recommendations and instructions of the medium manufacturers are to be observed.

Materials Required But Not Provided

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

Preparation And Storage Of Reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 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, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 2 months, provided proper storage. The ready to use wash solution can be used for at least one month when stored at 2...8°C.

Reagent preparation

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

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

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

Assay Procedure

The *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B can be performed in two ways:

1. Incubation without shaking; complete test duration 2 hours and 15 minutes
2. Incubation with shaking; complete test duration 1 hour and 15 minutes

Dilute samples with sample diluent (3) 1 : 6, e.g. 200 mg or 200 µl stool + 1.0 ml sample diluent (3) or transfer 2 - 4 inoculation loops of a *C. difficile* colony into a tube with 1.0 ml sample diluent (3) and mix thoroughly on a vortex.

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!

Avoid direct light exposure of the TMB substrate solution!

Working steps variant 1: without shaking

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Pipette: 100 µl **CONTROL +** positive control (4)
100 µl **CONTROL -** negative control (5)
100 µl **diluted stool specimen** or **culture suspension**.
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-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 / ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Working steps variant 2: with shaking

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Pipette: 100 µl **CONTROL +** positive control (4)
100 µl **CONTROL -** negative control (5)
100 µl **diluted stool specimen** or **culture suspension**.
3. Cover plate and incubate for 30 min at RT on an orbital shaker with a frequency of 500-700/min.
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 15 min at RT on an orbital shaker with a frequency of 500-700/min.
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-HRP-conjugate (6/2) per well.
9. Cover plate and incubate for 15 min at RT on an orbital shaker with a frequency of 500-700/min.
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 without shaking 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 absorbances higher than the cut-off value are considered positive, samples with absorbances 10% below the cut-off value are considered negative for *Clostridium difficile* toxin A and B antigen. Samples within 10 % below the cut-off up to the cut-off value have to be considered borderline and should be repeatedly tested. In case of repeated borderline result a second sample of the corresponding patient should be investigated.

Reference Values

| Serazym® C. difficile Toxin A+B | |
|--|-------------------------|
| Positive | > Cut-off |
| Borderline | 0,9 x Cut-off – Cut-off |
| Negative | < 0,9 x 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 negative as well as false positive results. Formalin treated samples may cause false positive results. A negative test result in the *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B does not exclude an infection: The overall interpretation of the ELISA results should always consider the microbiological examination as well as clinical findings.

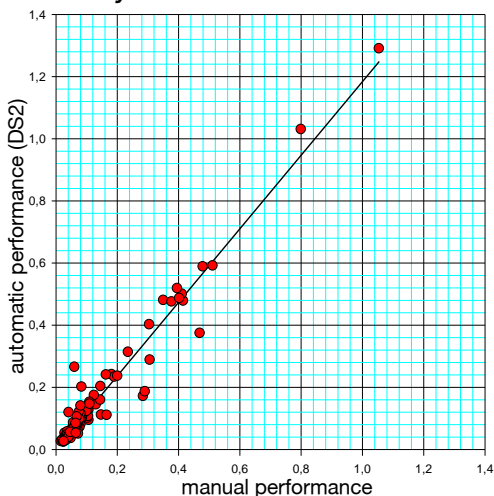
Automatic Processing

Performing the *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B 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 125 stool specimens was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with $r = 0.976$.

Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B



Performance Characteristics

Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*® Clostridium difficile Toxin A+B calculated from 8-fold determinations of samples:

| sample | mean OD | standard deviation | CV (%) |
|--------|---------|--------------------|--------|
| 1 | 1.386 | 0.042 | 3.0 |
| 2 | 0.506 | 0.017 | 3.3 |
| 3 | 0.332 | 0.028 | 8.5 |

Inter-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*® Clostridium difficile Toxin A+B in 5 different test runs on 2 different days from 8-fold determinations of samples:

| sample | mean OD | standard deviation | CV (%) |
|--------|---------|--------------------|--------|
| 1 | 1.321 | 0.102 | 7.7 |
| 2 | 0.485 | 0.034 | 6.9 |
| 3 | 0.345 | 0.037 | 10.8 |

Specificity and sensitivity

A total of 154 stool specimens were tested in parallel with the *Serazym*® Clostridium difficile Toxin A+B and another commercially available ELISA.

| | comparative ELISA positive | comparative ELISA negative |
|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>Serazym</i> ® ELISA positive | 103 | 4 |
| <i>Serazym</i> ® ELISA negative | 2 | 45 |

Specificity: 91.8% · Sensitivity: 98.0%

Cross reactivity

Faecal samples positive for one of the following intestinal bacteria did not show any cross reaction in the *Serazym*® Clostridium difficile Toxin A+B:

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.

Negative stool specimens have been spiked with $\geq 10^8$ colony forming units of the following microorganisms and tested negative with the *Serazym*® ELISA (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

| | |
|-------------------------------|--------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | (ATCC 7966) |
| <i>Bacillus cereus</i> | (ATCC 11778) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | (ATCC 6633) |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | (ATCC 25285) |
| <i>Candida albicans</i> | (ATCC 10231) |
| <i>Campylobacter coli</i> | (ATCC 33559) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | (ATCC 33291) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | (ATCC 8090) |
| <i>Clostridium sordellii</i> | (ATCC 9714) |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | (ATCC 13048) |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | (ATCC 13047) |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | (ATCC 29212) |

| | |
|---|--------------|
| <i>Escherichia coli</i> | (ATCC 25922) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | (ATCC 13883) |
| <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> | (ATCC 27337) |
| <i>Proteus vulgaris</i> | (ATCC 8427) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | (ATCC 10145) |
| <i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>enteritidis</i> | (ATCC 13076) |
| <i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i> | (ATCC 14028) |
| <i>Shigella flexneri</i> | (ATCC 12022) |
| <i>Shigella sonnei</i> | (ATCC 25931) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | (ATCC 25923) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | (ATCC 12228) |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | (ATCC 17802) |

The *C. sordellii* strain ATCC 9714 did not cross react in the *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B although some publications describe cross reactivities of toxins of some *C. sordellii* strains with anti-*C. difficile* toxin antibodies.

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 |
|------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 2020-07-21 | Intended Use | Correction |
| | Test Components | Correction |
| | Preparation And Storage Of Samples | Update |
| | Assay Procedure | Update |
| | Common Advices And Precautions | Update |
| | History of Changes | New section "History of Changes" |

Incubation Scheme *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B (E-040)

1.  pipette
 100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **diluted stool specimen** or culture suspension
 60 min incubation (RT) **alternatively 30 min while shaking**
 5 x wash with wash solution
2.  3 drops (or 120 µl) **CONJ BIOTIN** (6/1)
 30 min incubation (RT) **alternatively 15 min while shaking**
 5 x wash with wash solution
3.  3 drops (or 120 µl) **CONJ STREPT** (6/2)
 30 min incubation (RT) **alternatively 15 min while shaking**
 5 x wash with wash solution
4.  3 drops (or 120 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 15 min incubation protected from light (RT) **without shaking**
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 | |