

Serazym® Campylobacter

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Campylobacter Antigen
in Stuhlproben und Kultursuspensionen

REF E-093 ▽ 96 REF E-093-A2 ▽ 2x 96 IVD *In-vitro*-Diagnostikum CE



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Einführung

Bakterien der Gattung *Campylobacter* sind bewegliche gramnegative Stäbchen, die ubiquitär verbreitet den Gastrointestinaltrakt vieler Wild- und Haustiere, vor allem aber auch Nutztiere besiedeln und von dort Infektionen beim Menschen verursachen können (Anthropozoonosen). Die wichtigsten humanpathogenen Species sind die Durchfallerreger *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* und *C. lari*. *C. fetus* ist vorwiegend für extraintestinale Infektionen beim Menschen verantwortlich.

In Deutschland beträgt der Anteil der *Campylobacter*-Enteritiden an allen bakteriellen Enteritiden 10 - 16%. Dabei ist *C. jejuni* für 95% und *C. coli* für 5% der Fälle verantwortlich. *Campylobacter* Enteritiden treten das ganze Jahr über auf, gehäuft jedoch in den Sommer- bis frühen Herbst-Monaten. Die meisten Erkrankungen sind Einzelfälle, Ausbrüche sind selten. Die Übertragung erfolgt in erster Linie über verunreinigte Lebensmittel und die Inkubationszeit beträgt in Abhängigkeit von der Infektionsdosis 2 - 5 Tage. Die klinischen Symptome sind typischerweise akute, abdominale Schmerzen (ca. 80% der Fälle), die in der Regel von Fieber > 39°C (ca. 50%), allgemeinem Unwohlsein, Kopfschmerzen (ca. 50%) und Arthralgien (ca. 30%) begleitet sind. Nach etwa 12 - 24 Stunden treten Durchfälle (ca. 95%) auf, die breiig, wässrig oder blutig-eitrig sein können. Die Erkrankung verläuft in der Regel selbstlimitierend. Eine Antibiose ist nur in speziellen Fällen (z.B. Verdacht auf Septikämie) indiziert. Nach Abklingen der klinischen Symptome können die Erreger noch für ca. 2 - 4 Wochen mit dem Stuhl ausgeschieden werden. Als Folgeerkrankungen bzw. Komplikationen einer *Campylobacter* Enteritis können u.a. Kolitis, Septikämie, reaktive Arthritis oder das Guillain-Barré-Syndrom auftreten.

Die Diagnostik der akuten *Campylobacter*-Infektion erfolgt in erster Linie durch Erregeranzucht aus Stuhlproben auf selektiven Spezialnährböden. Inzwischen haben sich jedoch zunehmend immunologische Nachweisverfahren zum Antigennachweis aus Stuhlproben etabliert. Diese ELISA

Verfahren haben zum einen den Vorteil, dass das Ergebnis im Vergleich zur Kultur schneller vorliegt und ermöglichen darüber hinaus den Antigennachweis aus Proben, aus denen z.B. transportbedingt keine Anzucht mehr gelingt.

Literatur:

1. Heintschel, E. (1997) "Campylobacter" in Diagnostische Bibliothek Nr. 52, Blackwell Wissenschafts-Verlag.
2. Kist, M. (2000): „Lebensmittelbedingte Infektionen durch Campylobacter. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch- Gesundheitsschutz 45, 497-506, Springer-Verlag.
3. Snelling, W.J. et al (2005): „Under The Microscope Campylobacter jejuni“. Letters in Applied Microbiology 41, 297-302.

Anwendungsbereich

Der *Serazym*[®] Campylobacter ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum direkten Nachweis von *Campylobacter* in Stuhlproben und Kultursuspensionen.

Testprinzip

Der *Serazym*[®] Campylobacter ist ein direkter Zwei-Seiten-Assay auf der Basis polyklonaler Antikörper gegen Campylobacter spezifische Antigene. Verdünnte unbehandelte Stuhlproben oder Kultursuspensionen sowie negative und positive Kontrollproben werden in die mit polyklonalen anti-Campylobacter Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach der Inkubation werden die ungebundenen Komponenten durch einen Waschschrift entfernt und Peroxidase (POD)-markierte polyklonale anti-Campylobacter-Antikörper in die Kavitäten dispensiert. Nach erneuter Inkubation und einem weiteren Waschschrift 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/ \geq 620 nm gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Campylobacter-Antigene direkt proportional.

Testkomponenten

			Für 96 Kavitäten	Für 2x 96 Kavitäten
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit polyklonalen anti-Campylobacter-Antikörpern (Kaninchen)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung gelb vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung gelb 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	100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe	2x 100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe
4	CONTROL +	Positive Kontrolle <i>Campylobacter</i> positive Probe	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe	4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL -	Negative Kontrolle <i>Campylobacter</i> negative Probe	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe	4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6	CONJ HRP	POD-Konjugat POD-markierte polyklonale anti-Campylobacter-Antikörper (Kaninchen)	15 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt braune Kappe	25 ml · gebrauchsfertig grün 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 werden, oder bei -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Proben, die im *Serazym*[®] Verdünnungsmedium verdünnt wurden, können bis zu 72 h bei 2...8°C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

Vorbereitung und Verwendung

Antigennachweis aus Stuhlsuspensionen

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.

Antigennachweis aus Kultursuspensionen

Über 48 h auf Blut- oder Selektivagar gewachsene *Campylobacter* Kolonien können direkt im *Serazym*[®] *Campylobacter* getestet werden. In ein Reaktionsgefäß 1000 µl Verdünnungsmedium pipettieren. Mit einer sterilen Impföse 2 - 4 Impfösen von einer *Campylobacter* Kultur abnehmen und in das Verdünnungsmedium einrühren. Durch kräftiges Mischen auf einem Vortex-Schüttler suspendieren und 100 µl direkt im ELISA 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 (2ml) für die Probenverdünnung

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

Stuhlproben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 6 verdünnen, z.B. 200 mg oder 200 μ l Stuhlprobe + 1,0 ml Verdünnungsmedium (3), bzw. 2 - 4 Impfösen einer Campylobacter Kultur in 1,0 ml Verdünnungsmedium.

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

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

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Arbeitsschritte

- Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
- Je 100 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
100 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
100 µl **verdünnte Stuhlprobe** oder **Kultursuspension** pipettieren.
- Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
- Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
- 3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** POD-Konjugat (6) pro Kavität.
- Platte abkleben und 30 min bei RT inkubieren.
- Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
- 3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
- 10 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
- 3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln
- 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 + 0,10

Proben mit OD Werten, die über oder gleich des errechneten Grenzwertes liegen sind als positiv, Proben mit OD-Werten unterhalb des errechneten Grenzwertes sind als negativ im *Serazym*[®] *Campylobacter* zu bewerten.

Referenzwert

<i>Serazym</i>[®] <i>Campylobacter</i>	
Positiv	\geq Cut-off
Negativ	$<$ 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

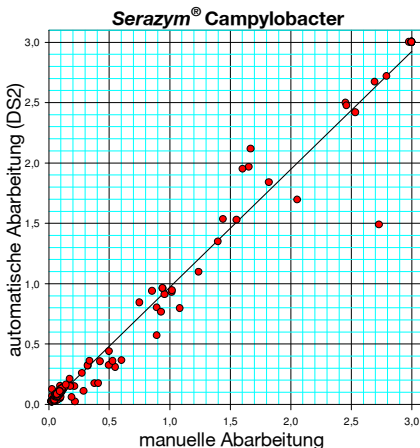
Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von *Campylobacter* Antigenen in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle in Korrelation gesetzt werden. Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien 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 *Serazym*[®] *Campylobacter* schließt eine Infektion nicht aus.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Serazym*[®] *Campylobacter* 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

Im Rahmen der Untersuchung von 239 Stuhlproben wurde bei parallel durchgeführter manueller und automatischer Abarbeitung (DS2, Dynex Technologies) ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,990$ ermittelt.



Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym*[®] *Campylobacter* aus 8-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	Extinktions-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	1,609	0,074	4,9
2	1,013	0,041	4,4
3	0,835	0,027	3,4
4	0,347	0,014	4,2

Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym*[®] *Campylobacter* in 6 verschiedenen Testläufen an zwei verschiedenen Tagen aus 8-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	Extinktions-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	1,580	0,095	6,0
2	1,029	0,099	9,6
3	0,797	0,038	4,8
4	0,341	0,023	6,8

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze des *Serazym*[®] Campylobacter wurde mit 2×10^4 KBE/ml bezogen auf *Campylobacter jejuni* bzw. 6 ng / well Campylobacter spezifische Antigene bestimmt. Beim Nachweis von *Campylobacter coli* liegt die untere Nachweisgrenze bei 1×10^6 KBE/ml.

Spezifität und Sensitivität

Im Rahmen von Vergleichsuntersuchungen wurden insgesamt 402 Stuhlproben getestet. Die Vergleichsuntersuchungen erfolgten retrospektiv parallel im *Serazym*[®] Campylobacter und einem anderen kommerziellen ELISA.

Spezifität und Sensitivität im Vergleich zu einem anderen kommerziellen ELISA:

	Vergleichs ELISA positiv	Vergleichs ELISA negativ
<i>Serazym</i> [®] ELISA positiv	138	2*
<i>Serazym</i> [®] ELISA negativ	1	263

Spezifität: 99,2% Sensitivität: 99,3%

* eine der beiden *Serazym*[®] ELISA positiven und Vergleichs ELISA negativen Proben war Kultur positiv; von der anderen Probe liegt kein Kultur-Ergebnis vor.

Sensitivität im Vergleich zur Kultur:

n= 68 Stuhlproben	Kultur positiv
<i>Serazym</i> [®] ELISA positiv	59
<i>Serazym</i> [®] ELISA negativ	9

Sensitivität im Vergleich zur Kultur: 86,8%

Kreuzreaktivität

Die Untersuchung von Stuhlproben mit einem positiven Erregernachweis der folgenden Spezies ergab keine falsch positiven Ergebnisse im *Serazym*[®] Campylobacter:

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Astrovirus*, *Candida albicans*, *Clostridium difficile*, *Cryptosporidium spec.*, *Giardia lamblia*, *Hafnia alvei*, *Helicobacter pylori*, *Norovirus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rotavirus*, *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, nicht Enterotoxin bildend: *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin bildend, *Yersinia enterocolitica* O:3.

Negative Stuhlsuspensionen wurden mit folgenden Mikroorganismen mit einer Keimzahl von $\geq 10^8$ Kolonie bildenden Einheiten pro ml aufgestockt und im *Serazym*[®] ELISA negativ getestet (OD 450 / 620nm < 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 fetus</i>	(ATCC 27374)
<i>Campylobacter lari</i>	(ATCC 35221)
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	(ATCC 43954)
<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)

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 (1,25%), 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%), Pentofuryl® (2 mg/ml), Pepto-Bismol (1 mg/ml), Perenterol (2,5 mg/ml), Rennie® (8 mg/ml), Simgel® (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 *Serazytt*® Stuhiteste 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
2020-11-04	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung
	Änderungshistorie	Einführung des Abschnittes "Änderungshistorie"
	Testkomponenten	Aktualisierung

Inkubationsschema *Serazym*[®] Campylobacter (E-093)

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 (lichtgeschützt bei Raumtemperatur)
4.  3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** (8)
Messung der OD bei 450 / ≥ 620 nm

 Hersteller	 Herstellungsdatum	 Verwendbar bis	LOT Charge	REF Artikelnummer
 Vor Sonnenlicht schützen	 Temperaturbegrenzung	 Biologische Risiken	 Nicht wiederverwendbar	
 Gebrauchsanweisung beachten	 Achtung	IVD <i>In-vitro</i> - Diagnostikum	 Ausreichend für <n> Prüfungen	

Serazym[®] Campylobacter

Enzyme immunoassay for detection of Campylobacter in stool specimens and culture suspensions

REF E-093 ▽ 96 REF E-093-A2 ▽ 2x 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 *Campylobacter* represents a group of versatile, gram-negative rod-shaped bacteria. *Campylobacter* commonly inhabits the intestine of wild and domesticated animals and from there can be transmitted to man (anthropozoonosis). The most important human pathogenic species are the diarrhea-causing *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* and *C. lari*, whereas *C. fetus* is mainly responsible for extraintestinal infections. In Germany *Campylobacter* is responsible for 10 - 16% of all bacterial enteritis cases with *C. jejuni* accounting for 95% and *C. coli* for 5% of the cases. *Campylobacter* infections occur throughout the year but accumulate during the summer and in the early autumn months. Most of the infections are single cases; outbreaks are rather unusual. *Campylobacter* infections are mainly transmitted via contaminated food and the incubation time varies between 2 - 5 days in dependence of the infection dose. Typical clinical symptoms are acute abdominal pain (80% of the cases), fever > 39°C (50%), indisposition, headache (50%) and arthralgia (30%). After 12 - 24 hours 95% of the patients develop watery or bloody to purulent diarrhea. *Campylobacter* enteritis is usually self-limiting and antibiotic therapy is not indicated except for special cases, e.g. suspect of septicemia. *Campylobacter* can be shed with the faeces for 2 - 4 weeks after decay of clinical symptoms. Post-infectious complications of *Campylobacter* enteritis like colitis, septicemia, reactive arthritis or Guillain-Barré-syndrome may occur. Diagnostic of acute *Campylobacter* infections is primarily done by culture on selective culture media, but recently immunological detection methods like ELISA have been implemented in routine diagnosis. Antigen detection by ELISA is advantageous because it is less time-consuming in comparison to culture and it enables pathogen-detection from samples where culture fails due to nonviable bacteria.

References:

1. Heintschel, E. (1997) "Campylobacter" in Diagnostische Bibliothek Nr. 52, Blackwell Wissenschafts-Verlag.
2. Kist, M. (2000): „Lebensmittelbedingte Infektionen durch Campylobacter. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch- Gesundheitsschutz 45, 497-506, Springer-Verlag.
3. Snelling, W.J. et al (2005): „Under The Microscope Campylobacter jejuni“. Letters in Applied Microbiology 41, 297-302.

Intended Use

The *Serazym*[®] Campylobacter is an *in-vitro*-diagnostic medical device for direct detection of *Campylobacter* specific antigens in stool specimens and culture suspensions.

Principle Of The Test

Serazym[®] Campylobacter is a direct solid-phase immunoassay for the qualitative determination of *Campylobacter* based on polyclonal antibodies. *Campylobacter* antigens from stool specimens or culture suspensions and the positive control react with polyclonal anti-Campylobacter antibodies coated on the solid phase of the microplate. After incubation non-bound material is removed by a washing step. Subsequently bound antigens specifically react with horseradish peroxidase (HRP) labeled polyclonal anti-Campylobacter antibodies during a second incubation period. 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 *Campylobacter* antigens. After consideration of the cut-off value, results are interpreted as positive or negative.

Test Components

			For 96 Wells	For 2x96 Wells
1	WELLS	Microtitration plate coated with polyclonal anti-Campylobacter antibodies (rabbit)	12 single breakable 8-well strips colour coding yellow vacuum-sealed with desiccant	2x 12 single breakable 8-well strips colour coding yellow 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>Campylobacter</i> positive 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>Campylobacter</i> negative sample	2.0 ml · ready to use coloured blue green cap	4.0 ml · ready to use coloured blue green cap
6	CONJ HRP	HRP-conjugate HRP-labelled polyclonal anti-Campylobacter antibodies (rabbit)	15 ml · ready to use coloured green brown cap	25 ml · ready to use coloured green 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 immediately after collection and processed within 72 hours or stored 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 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.

Antigen detection from culture suspensions

Colonies of *Campylobacter* grown on blood or selective agar under microaerophilic conditions for 48 hours can be tested directly in the *Serazym*[®] Campylobacter:
Pipette 1000 µl of sample diluent into a clean tube, transfer 2 - 4 inoculating loops of a *Campylobacter* culture into the sample diluent and suspend on a vortex mixer. Use 100 µl for ELISA testing.

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 450 nm filter 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 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

Dilute samples with sample diluent (3) 1 : 6, e.g. 200 mg or 200 μ l stool + 1.0 ml sample diluent (3) or transfer 2 - 4 inoculation loops of a Campylobacter 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 and that the remaining fluid is completely drained in every single wash cycle!

Avoid direct 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 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 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) **SUBSTR 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 higher than or equal to the cut-off value are considered positive, samples with OD values below the cut-off value are considered negative for *Campylobacter* antigen.

Reference Values

Serazym® Campylobacter	
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 test performance)
 ≤ 0.30 (automatic test 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

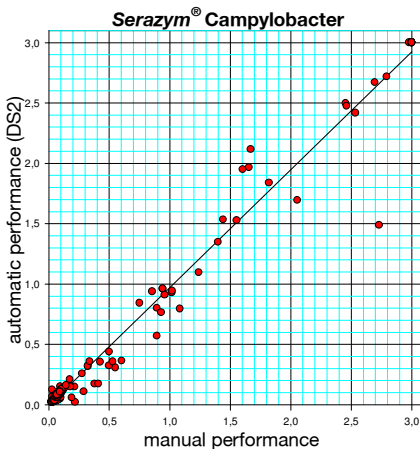
There is no correlation between measured absorbance and seriousness of the infection. It is also not allowed to correlate absorbances of the samples with that of the positive control. Cross contamination of reagents and samples can produce false positive results. Incorrect dilutions, not sufficiently homogenized samples or solid particles after centrifugation of the suspension can cause false negative as well as false positive results. A negative test result in the *Serazym*[®] Campylobacter 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*[®] Campylobacter on fully automated microplate processors (e.g. DS2 or 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 239 stool specimens was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with $r = 0.990$.



Performance Characteristics

Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*[®] Campylobacter calculated from 8-fold determinations of samples:

sample	mean absorbance	standard deviation	CV (%)
1	1.609	0.074	4.9
2	1.013	0.041	4.4
3	0.835	0.027	3.4
4	0.347	0.014	4.2

Inter-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*[®] Campylobacter in 6 different test runs on 2 different days from 8-fold determinations of samples:

sample	mean absorbance	standard deviation	CV (%)
1	1.580	0.095	6.0
2	1.029	0.099	9.6
3	0.797	0.038	4.8
4	0.341	0.023	6.8

Lower detection limit

The lower detection limit of the *Serazym*[®] Campylobacter is 2x 10⁴ CFU/ml (*Campylobacter jejuni* cell suspension) and 6 ng/well (Campylobacter specific antigens) resp. and 1x 10⁶ CFU/ml for the detection of *Campylobacter coli*.

Specificity and sensitivity

A total of 402 stool specimens were tested retrospectively in parallel with the *Serazym*[®] Campylobacter and another commercially available ELISA.

Specificity and sensitivity in comparison to another commercial ELISA

	comparative ELISA positive	comparative ELISA negative
<i>Serazym</i> [®] ELISA positive	138	2*
<i>Serazym</i> [®] ELISA negative	1	263

Specificity: 99.2% Sensitivity: 99.3%

*one of these samples was culture positive; no culture result was available from the second sample.

Sensitivity in comparison to culture

n= 68 stool samples	culture positive
<i>Serazym</i> [®] ELISA positive	59
<i>Serazym</i> [®] ELISA negative	9

Sensitivity in comparison to culture: 86.8%

Cross reactivity

Faecal samples positive for one of the following pathogens did not show any cross reaction in the *Serazym*[®] Campylobacter:

Aeromonas caviae, *Aeromonas hydrophila*, *Astrovirus*, *Candida albicans*, *Clostridium difficile*, *Cryptosporidium spec.*, *Giardia lamblia*, *Hafnia alvei*, *Helicobacter pylori*, *Norovirus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rotavirus*, *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, enterotoxin positive; *Staphylococcus aureus*, enterotoxin negative, *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 (OD450/620nm < 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 fetus</i>	(ATCC 27374)
<i>Campylobacter lari</i>	(ATCC 35221)
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	(ATCC 43954)
<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)

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 (1.25%), 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
2020-xx-xx	Common Advices and Precautions	Update
	History of Changes	Adding section "History of Changes"
	Test Components	Update

Incubation Scheme *Serazym*[®] Campylobacter (E-093)











1.  pipette
 100 µl **CONTROL** + (4)
 100 µl **CONTROL** - (5)
 100 µl **diluted stool specimen or culture suspension**

 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

 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	

