RIDASCREEN® Verotoxin

Enzymimmunoassay zum Nachweis
von Verotoxin 1 und 2

Enzyme immunoassay for the detection
of Verotoxin 1 and 2

Art. No.: C 2201

CE

In vitro Test
Lagerung bei 2 – 8 °C
Storage at 2 – 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG
Dolivostr. 10
D-64293 Darmstadt
www.r-biopharm.com

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme	(0 61 51) 81 02-0
Sekretariat Marketing	(0 61 51) 81 02-23

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme	(0 61 51) 81 02-20 orders@r-biopharm.de
Marketing	(0 61 51) 81 02-40 info@r-biopharm.de

RIDA® und RIDASCREEN®
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm AG
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

———————

RIDA® and RIDASCREEN®
are registered trademarks of R-Biopharm AG
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Allgemeines 4
2. Einleitung 4
3. Testprinzip 6
4. Packungsinhalt 6
5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör 7
6. Vorsichtsmaßnahmen 7
7. Reagenzien und ihre Lagerung 8
8. Anzeichen für Reagenzienverfall 8
9. Sammlung und Lagerung der Proben 8
10. Testdurchführung 9
11. Auswertung 13
12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation 14
13. Klinische Ergebnisse 15

Contents

page

1. Intended use 21
2. General 21
3. Test principle 23
4. Reagents provided 23
5. Reagents required but not provided 24
6. Warnings and precautions for the users 24
7. Storage instructions 25
8. Indication of instability or deterioration of reagents 25
9. Specimen collection and storage 25
10. Test procedure 26
11. Analysis 29
12. Remarks about the test procedure and interpretation 30
13. Clinical results 31

Appendix

Literature 37

1. Allgemeines

Der RIDASCREEN® Verotoxin Test ist ein in vitro Diagnostikum zum Nachweis der Verotoxine 1 und 2 (Shiga-like Toxine I und II) von Escherichia coli in Stuhlproben und in Anreicherungskulturen.

2. Einleitung

Enterobacteriaceen der Art Escherichia coli (E. coli) sind Bestandteil der gesunden Darmflora des Menschen, aber auch vieler landwirtschaftlicher Nutztiere. Deshalb gelten sie auch als Indikator für fäkale Verunreinigungen von Gewässern und Lebensmitteln. Es sind gramnegative, durch peritriche Begeißelung bewegliche, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. Auf Grund von O-Antigenen (LPS der äußeren Membran) und H-Antigenen (Geißelantigene) können E. coli in verschiedene Serovare unterteilt werden.
Durch verschiedene, oft plasmidcodierte oder durch Phagen übertragene Pathogenitätsfaktoren sind E. coli als fakultativ pathogen zu betrachten. Seit 1977 sind E. coli bekannt, die zur Produktion zweier Zytotoxine, Verotoxin 1 und 2, befähigt sind. Die Gene für diese Verotoxine (VT) sind auf dem Chromosom im Bereich eines Prophagen lokalisiert. Es wurden E. coli isoliert, die beide Gene oder auch nur eins der beiden enthielten. Wegen der Ähnlichkeit der Verotoxine zum Shiga-Toxin von Shigella dysenteriae werden sie auch als Shiga-like Toxine I und II (SLT-I und -II) bezeichnet. Ein Teil dieser Verotoxin-bildenden E. coli (VTEC) kann durch die Ausbildung weiterer Pathogenitätsfaktoren schwere hämorrhagische Diarrhöen verursachen. Der „Prototyp“ dieser enterohämorrhagischen E. coli (EHEC) wurde erstmals 1982 beschrieben; er gehörte dem Serovar O157:H7 an. Inzwischen sind aber EHEC der verschiedensten O-Serovare beschrieben. Wichtige zusätzliche Pathogenitätsfaktoren, die den Typ EHEC charakterisieren, sind ein plasmidcodiertes Enterohämolysin und ein Intimin-Adhäsin, dessen Gen (eae A) zusammen mit Genen anderer Virulenzfaktoren in einer Pathogenitätsinsel (PAI = Pathogenicity Island) auf dem Chromosom lokalisiert ist.
Die klinischen Symptome, die durch EHEC verursacht werden, reichen von leichten Durchfällen über schwere Gastroenteritiden bis hin zur hämorrhagischen Colitis, die in ca. 10 bis 20 % der Infektionen vorkommt. Als lebensbedrohliche postinfektiöse Komplikation kann es bei 5 - 10 % der Infektionen besonders bei Säuglingen und kleinen Kindern, aber auch bei alten oder immungeschwächten Patienten zur Ausbildung eines hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) oder einer thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) kommen. Die Letalität bei HUS und TTP ist besonders im Kindesalter hoch (ca. 10 - 15 %). Es kann akutes Nierenversagen mit vorübergehender Dialysepflicht, aber auch ein irreversibler Verlust der Nierenfunktion mit daraus resultierender ständiger Dialyse eintreten.

Die Ausprägung des klinischen Bildes ist zum einen von der Prädisposition des Patienten abhängig, zum anderen aber auch vom entsprechenden EHEC-Phänotyp; dies bedeutet, dass der Krankheitsverlauf auch von der unterschiedlichen Expression der Pathogenitätsfaktoren abhängt. Hierbei spielen auch heute noch unbekannte Faktoren eine Rolle.
Die Inkubationszeit liegt in Abhängigkeit von der Infektionsdosis bei 1 bis 3 Tagen. Sie kann aber auch 8 Tage betragen. Wegen einer hohen Umweltresistenz und einer relativen Säuretoleranz liegt die Infektionsdosis für EHEC nur bei 100 Keimen. Infektionsquellen sind von Rindern, Schafen oder Ziegen gewonnene kontaminierte Lebensmittel, besonders rohes oder nicht ausreichend erhitztes Fleisch oder Fleischprodukte und nicht pasteurisierte Roh- oder Vorzugsmilch. Aber auch Infektionsketten von Mensch zu Mensch, besonders in Gemeinschaftseinrichtungen wie Kindergärten, Altenheimen oder Krankenhäusern, sowie direkte Kontakte zu Tieren sind von Bedeutung. In der Umgebung von Patienten wurden auch klinisch asymptomatische Ausscheider nachgewiesen.
In der Diagnostik einer EHEC-Infektion haben sich einige der zunächst eingeschlagenen Wege als nicht ausreichend herausgestellt. Da nur ca. 1 % der E. coli, die nicht zur Gruppe der EHEC gehören, die Fähigkeit zur Bildung eines Enterohämolysins besitzen, ist der Nachweis von enterohämolytischen Colibakterien auf Blut-Agar sicher ein wichtiger Hinweis auf EHEC. Es gibt aber auch EHEC, die aus HUS-Patienten isoliert wurden und kein Enterohämolysin exprimieren. Weiterhin hat sich gezeigt, dass der zuerst gefundene Typ O157 nur für 70 - 80 % der HUS-Fälle in Deutschland verantwortlich ist. Bei reinen Gastroenteritiden überwiegen sogar andere Serovare. Deshalb ist ein alleiniger Nachweis des Serovars O157 nicht ausreichend. Die heute empfohlene Vorgehensweise in der Diagnostik ist eine Voranreicherung des Erregers über Nacht in mTSB-Medium (mit Mitomycin C-Zusatz, 50 ng/ml) mit anschließender Isolierung. Gleichzeitig sollte versucht werden, aus dem Kulturüberstand Verotoxin als sichersten Pathogenitätsfaktor nachzuweisen. Dies kann immunologisch mittels ELISA oder durch Nachweis des zytopathischen Effekts auf eine Verozellkultur erfolgen. Im Vergleich zum Zytotoxizitätstest auf Verozellen ist die ELISA-Technik, wie sie der RIDASCREEN® Verotoxin EIA bietet, eine einfache und in jedem Labor durchführbare Methode. Eine Voranreicherung des Keimes ist bei beiden Methoden erforderlich, da die Keimausscheidung und auch der Toxingehalt im Stuhl sehr niedrig sein können. Besonders bei HUS- und TTP-Patienten kann die Ausscheidung auch vollkommen eingestellt sein.
Um im Einzelfall ein schnelles Ergebnis zu erhalten, kann versucht werden, den Toxinnachweis direkt aus der Stuhlprobe ohne vorhergehende Anreicherung zu führen. Wegen mangelnder Sensitivität dieser Vorgehensweise darf ein negatives Ergebnis aber nur als vorläufiger Hinweis verstanden werden. Hier ist das Anreicherungsergebnis abzuwarten.

Als Therapie kann bei HUS oder TTP nur eine symptomatische Behandlung empfohlen werden. Diese besteht in der Regel in einer forcierten Diurese und Plasmapherese. Bei totaler Niereninsuffizienz erfolgt eine Hämo- oder Peritonealdialyse. Eine antibakterielle Chemotherapie ist im allgemeinen nicht angezeigt, da hierdurch die Bakterienausscheidung verlängert wird und eine Toxinbildung sogar stimuliert werden kann.

3. Testprinzip

Bei dem vorliegenden Test handelt es sich um einen Enzymimmunoassay (ELISA). An die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind monoklonale Antikörper gegen die Verotoxine 1 und 2 gebunden. In diese Vertiefungen werden die zu untersuchenden Proben sowie die Kontrollen pipettiert. Anschließend wird bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschritt werden mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Antikörper gegen die Verotoxine dazu gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert.
Bei Anwesenheit von Verotoxin bildet sich ein Sandwich-Komplex aus immobilisierten Antikörpern, Verotoxinen und konjugierten Antikörpern.
Nicht gebundene Enzym-markierte Antikörper werden in einem Waschschritt entfernt. Nach der Zugabe von Substrat/Chromogen wandelt bei positiven Proben gebundenes Enzym die farblose Lösung in der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm (optional: Referenzwellenlänge $\geq$ 600 nm). Die gemessene Farbintensität ist proportional zur Konzentration der in der Probe befindlichen Toxinmenge.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.
Jeder Reagenziensatz enthält:

1 x 12 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen (teilbar) im Halterahmen;
beschichtet mit monoklonalen Ak (Maus) gegen Verotoxin 1 und 2;
in verschließbarem Alu-Beutel
1 x Verotoxin-Probenpuffer (55 ml);
75 mM Phosphatpuffer; pH 7,4; gebrauchsfertig
1 x Waschpuffer (100 ml, 10fach konz., brauner Verschluss);
pH 7,2; enthält 0,1 % Thimerosal
1 x Positiv-Kontrolle (1,8 ml); ..... Reagenz 3
inaktivierte Verotoxine, gebrauchsfertig

1 x Enzym-Konjugat (10 ml); ..... Reagenz 4
Peroxidase-markierte monoklonale Ak (Maus)
gegen Verotoxin 1 und 2, gebrauchsfertig;
grün gefärbt
1 x Substrat/Chromogen (10 ml);
Peroxid/TMB, gebrauchsfertig
1 x Stopp-Reagenz (6 ml); ..... Reagenz C
1 N Schwefelsäure
1 x Gebrauchsanweisung

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

5.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

5.2. Zubehör

- RIDA® Anreicherungsbouillon (Art. Nr. Z 1000)
- Einwegpipetten (Art. Nr.: Z 0001)
- Mikropipetten für verschiedene Volumina 50 - 100 µl
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, evtl. Referenzfilter ≥ 600 nm)
- Filterpapier (Labortücher)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Die im Kit befindliche Positiv-Kontrolle enthält inaktiviertes Verotoxin. Dennoch sollte sie, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Der Waschpuffer enthält als Konservierungsmittel 0,1 % Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Harnstoffperoxid kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben!

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden!

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien ist zwischen Kits verschiedener Chargennummern nicht möglich.

Mikrotiterstreifen oder Reagenzien dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Fläschchen undicht sind.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 – 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
Vor Verwendung sind die Reagenzien und die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur zu bringen. Zur Vermeidung von Kondenswasser in den Streifen sind diese erst nach Erreichen der Raumtemperatur ihrer Verpackung zu entnehmen. Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 – 8 °C zu lagern.
Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat/Chromogen ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autoxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung darf das Substrat/Chromogen nicht mehr verwendet werden.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Folgende Kriterien können einen Reagenzienverfall anzeigen:

- eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates/Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- ein Extinktionswert der Negativ-Kontrolle bei 450 nm $\geq$ 0,25
- ein Extinktionswert der Positiv-Kontrolle bei 450 nm $<$ 0,8

9. Sammlung und Lagerung der Proben

Stuhlproben sollten während der akuten Phase einer Gastroenteritis oder hämorrhagischen Colitis genommen werden. Die Proben sollten möglichst frisch und innerhalb von 24 Stunden untersucht werden. Eine längere Aufbewahrung der Probe ist bei 2 – 8 °C bis zu 3 Tagen möglich. Das Einfrieren der Proben ist nicht

zu empfehlen, da die EHEC-Keime darunter leiden und in der Anreicherungskultur dann nicht mehr gut vermehrungsfähig sind. Verotoxin kann allerdings nach Einfrieren der Stuhlprobe noch nachgewiesen werden, sofern es vor dem Einfrieren schon in ausreichender Menge vorlag. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen sollte allerdings vermieden werden.
Bei Umgebungsuntersuchungen sollten auch Stuhlproben von klinisch unauffälligen Kontaktpersonen genommen werden, um asymptomatische Träger zu identifizieren.

10. Testdurchführung

10.1. Allgemeines

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur zu bringen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Reproduzierbare Ergebnisse hängen in starkem Maße vom genauen Pipettieren, Einhalten der Inkubationszeiten und -temperatur sowie vom gleichmäßigen Waschen der Mikrotiterstreifen ab. Während des Waschens ist darauf zu achten, dass alle Vertiefungen mit Waschpuffer gefüllt werden, und dass zwischen den Waschschritten keine Flüssigkeit in den Vertiefungen verbleibt. Zwischen den einzelnen Waschschritten dürfen die Vertiefungen nicht austrocknen.
Direkte Sonneneinstrahlung ist während der Durchführung des Testes zu vermeiden. Es wird empfohlen die Mikrotiterplatte abzudecken.
Mit Ausnahme des Waschpuffers sind alle Reagenzien gebrauchsfertig.

10.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates (Reagenz 2) wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen. Der fertige Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 – 8 °C vier Wochen lang haltbar.

10.3. Vorbereitung der Proben

Um schnell ein erstes Ergebnis zu erhalten, kann ein direkter Toxinnachweis aus der Stuhlprobe durchgeführt werden. Wegen der Möglichkeit eines zu geringen Toxingehaltes im Stuhl ist ein negatives Ergebnis aber nicht mit einem negativen EHEC-Befund gleichzusetzen.

Zur Erzielung einer größeren Sensitivität sollte generell - auch bei negativem Stuhlbefund - der Toxinnachweis aus einer Anreicherungskultur geführt werden. In Deutschland wird z. Z. die Anreicherung über Nacht in einer Schüttelkultur bei 37 °C in mTSB-Medium mit Mitomycin C Zusatz (50 ng/ml) empfohlen.
Andere Anreicherungsmedien wie BRILA oder GN-Bouillon zeigten im RIDASCREEN® Verotoxin EIA keine negativen Einflüsse (Matrixeffekte); sie entsprechen jedoch nicht dem von den Fachverbänden empfohlenen Anreicherungsmedium.

10.3.1. Untersuchung von frischen oder tiefgefrorenen Stuhlproben

Die Stuhlprobe wird mit Verotoxin Probenpuffer 1:5 (v/v) verdünnt. Hierfür wird mit einer Einwegpipette (Art. Nr.: Z 0001) 1 ml flüssiger Stuhl entnommen und in einem gekennzeichneten Röhrchen mit 4 ml Puffer gemischt. Bei festen Stühlen wird mit einer Einmal-Impföse ein entsprechendes Volumen abgenommen. Das Homogenisieren der Stuhlsuspension erfolgt entweder durch Aufsaugen und Ausstoßen mit der Einwegpipette oder alternativ durch Mischen auf einem Vortexmixer. Nach kurzem Stehenlassen (10 min., Klärsedimentation) werden 100 µl vom Überstand der Suspension direkt im Test eingesetzt.

Achtung!
Der Nachweis aus der nicht angereicherten Stuhlprobe kann aufgrund der geringen Sensitivität nur als schnelles Vorscreening im Falle hoher anamnestischer Dringlichkeit gelten. Ein negatives Ergebnis ist nicht aussagefähig. In diesem Fall sollte das Ergebnis der Testung aus der Anreicherung abgewartet werden.

10.3.2. Untersuchung von Proben aus der Anreicherungskultur

Die hier beschriebene Vorgehensweise entspricht den Empfehlungen des RKI (Robert-Koch-Institut) und BGVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin).
Bitte beachten Sie auch die Testanleitung zur RIDA® Anreicherungsbouillon (Art.-Nr. Z 1000).
Der Überstand einer Anreicherungskultur (RIDA® Anreicherungsbouillon) ist nach kurzer Zentrifugation ohne weitere Verdünnung direkt im Test einsetzbar.

Achtung!
Auf die Temperaturangleichung zwischen der Bouillon und der Negativkontrolle (beide sollten bei Testbeginn auf RT adaptiert sein, maximal 25 °C) ist zu achten. Erhöhte Bouillontemperaturen können falsche, positive OD-Werte verursachen.

Zunächst werden 100 µl flüssiger Stuhl oder eine äquivalente Menge (50 – 100 mg) einer festen Stuhlprobe in 4 ml mTSB mit Mitomycin C (z. B. RIDA® Anreicherungsbouillon, Art. Nr. Z 1000) übertragen und unter Schütteln (ca. 120 - 160 rpm) und ausreichender Sauerstoffzufuhr bei 37 °C für 18 bis maximal 24 Stunden inkubiert. Zum Schütteln eignen sich Horizontalschüttler oder Rotationsmischer.
Nach der Inkubation wird die gesamte Probe bei 3000 U/min ca. 15 min zentrifugiert. Vom Überstand werden 100 µl im ELISA-Test eingesetzt.

Die Sedimente ebenso wie die Originalstuhlproben sind für eine spätere Bestätigung aufzubewahren. Die ideale Aufbewahrung erfolgt durch Aufnahme des Sediments mit einem Tupfer und Überführung desselben in Stuart- oder Cary Blair-Medium und Lagerung bei 2 – 8 °C bis zum Versand (im Falle eines positiven ELISA-Ergebnisses).

10.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden 2 Tropfen (ca. 100 µl) der Positiv-Kontrolle (Reagenz 3), des Verotoxin Probenpuffers (Negativ-Kontrolle) bzw. der Proben (Überstand aus Anreicherungsbouillon oder Stuhlsuspension) in die Vertiefungen getropft und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

10.5. Waschen

Die Kavitäten werden geleert und die Platte anschließend auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird fünfmal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen zu sorgen.

Bei der Verwendung von Waschautomaten sollte das Entfernen der Stuhlsuspension manuell durchgeführt werden. Während des Waschens muß auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden. Nach dem letzten Waschschritt sollte die Platte gründlich auf Labortüchern ausgeschlagen werden.

10.6. Zweite Inkubation

2 Tropfen des Enzym-Konjugates (Reagenz 4) werden in die Kavitäten gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

10.7. Waschen

Waschen gemäß Pkt. 10.5.

10.8. Dritte Inkubation

2 Tropfen des Substrates/Chromogens werden in die Kavitäten gegeben und bei Raumtemperatur 15 Minuten im Dunkeln inkubiert.
Danach wird durch Zugabe von 1 Tropfen Stopp-Reagenz (Reagenz C) in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm gemessen (optional: Referenzwellenlänge $\geq$ 600 nm). Der Abgleich des Nullwertes sollte gegen Luft - also ohne Mikrotiterplatte - erfolgen.

Hinweis:
Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Substrates/Chromogens verursachen.

Zusammenfassung der Testdurchführung

1. Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2. Pipettieren von je 2 Tropfen der Probensuspension, Positiv- und Negativ-Kontrolle in die Mikrotiterstreifen; 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
3. Entleerung der Kavitäten; anschließend 5-maliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer
4. Pipettieren von 2 Tropfen Enzym-Konjugat; 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
5. Entleerung der Kavitäten; anschließend 5-maliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer
6. Pipettieren von 2 Tropfen Substrat/Chromogen; 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln
7. Nach Zugabe von 1 Tropfen Stopp-Reagenz photometrische Auswertung

11. Auswertung

11.1. Qualitätskontrolle

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positiv- und Negativ-Kontrollen mitzuführen, um Reagenzien-Stabilität und korrekte Testdurchführung sicherzustellen. Die Kontrollen sind erforderlich, um eine eventuelle Reagenzienschwäche anzuzeigen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert der Negativ-Kontrolle bei 450 nm kleiner 0,25 OD und der Extinktionswert der Positiv-Kontrolle größer oder gleich 0,8 OD ist. Ist der Wert der Negativkontrolle größer 0,25 OD, kann dies ein Zeichen für ungenügendes Waschen sein. Werden die erwarteten Werte nicht erreicht, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Kitkomponenten sollten visuell auf Kontamination oder Undichtigkeiten kontrolliert werden. Eine bläulich gefärbte Substrat-/Chromogenlösung darf nicht mehr verwendet werden

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

11.2. Berechnung des Grenzwertes (cut-off)

In Abhängigkeit vom untersuchten Probenmaterial (Überstand von Anreicherungskulturen bzw. native Stuhlprobe) ist bei der Auswertung des Testes ein unterschiedlicher Grenzwert zu berücksichtigen.

11.2.1. Untersuchung von Proben aus einer Anreicherungskultur

Zur Festlegung des cut-off werden zu der gemessenen Extinktion der Negativ-Kontrolle 0,1 Extinktionseinheiten hinzuaddiert.

cut-off = Extinktionswert der Negativ-Kontrolle + 0,1

11.2.2. Untersuchung von frischen oder tiefgefrorenen Stuhlproben (ohne Anreicherung)

Zur Festlegung des cut-off werden zu der gemessenen Extinktion der Negativ-Kontrolle 0,2 Extinktionseinheiten hinzuaddiert.

cut-off = Extinktionswert der Negativ-Kontrolle + 0,2

11.3. Beurteilung der Ergebnisse

Als **positiv** werden solche Proben beurteilt, deren Extinktionswert größer oder gleich dem errechneten cut-off ist.

Als **negativ** werden solche Proben beurteilt, deren Extinktionswert kleiner als der errechnete cut-off ist.

Proben, deren Extinktionswert in einem Bereich von 10 % oberhalb oder unterhalb des errechneten cut-off liegt, sollten nicht als eindeutig positiv oder negativ bewertet werden, sondern sind als fraglich einzustufen. Es wird empfohlen, diese Proben nochmals zu bestimmen.

12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation

Der RIDASCREEN® Verotoxin Test weist aus Stuhlproben oder Anreicherungskulturen die Verotoxine 1 und 2 von verotoxinbildenden E. coli nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Extinktionswertes und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren. Ein positiver Toxinbefund bei gleichzeitiger Identifizierung des Keimes gilt als die sicherste Methode zum Nachweis von EHEC.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger nicht aus.

Manche EHEC-Stämme produzieren nur geringe Mengen an Verotoxin. Wegen des oft geringen Verotoxingehaltes einer Stuhlprobe ist der direkte Toxinnachweis aus Stuhl als alleinige Methode nicht ausreichend sensitiv. Ein positiver Toxinbefund aus dem Stuhl gibt einen schnellen Hinweis auf eine mögliche EHEC-Infektion. Bei einem negativen Ergebnis kann aber eine EHEC-Infektion nicht ausgeschlossen werden.

Bei einem positiven Toxinnachweis sollte in jedem Fall die Isolierung von E. coli angeschlossen werden. Nur über die Identifizierung und Charakterisierung des Erregers kann eine Verbindung zwischen nachgewiesenem Toxin und der klinischen Symptomatik hergestellt werden.

Trotz des Vorliegens einer EHEC-Infektion kann der Toxinnachweis aus einer Anreicherungskultur negativ ausfallen. In Abhängigkeit von den Kulturbedingungen kann die Anreicherung suboptimal verlaufen. Zusätzlich kann trotz gelungener Anzucht von E. coli der Toxingehalt im Kulturmedium so gering sein, dass ein Test hierauf negativ ausfällt. Ursache hierfür kann der geringe Anteil von EHEC an der physiologischen E. coli-Flora sein (teilweise nur ein EHEC auf 200 - 300 E.

coli), aber auch eine Einstellung der Toxinproduktion und -ausscheidung unter bestimmten Wachstumsbedingungen. So ist es möglich, dass der Toxinnachweis direkt aus dem Stuhl (schwach) positiv ausfällt, der Nachweis aus der Kultur aber negativ verläuft.

Wegen der äußerst sensitiven Einstellung des RIDASCREEN® Verotoxin ELISA kann bei der Untersuchung von nativem Stuhl ein grenzwertiges oder schwach positives Ergebnis aber auch durch unspezifische Matrixeffekte verursacht werden. Deshalb ist bei der direkten Untersuchung von Stuhl auf gründlichstes Waschen zu achten.

Bei Ausbildung von postinfektiösen Syndromen wie HUS oder TTP kann die Erregermenge im Stuhl bereits soweit abgesunken sein, dass eine Isolierung des Keimes nicht mehr möglich ist. In diesem Fall fällt auch der Verotoxin ELISA negativ aus. Deshalb ist es wichtig, Stuhlproben möglichst früh während der enteritischen Phase zu untersuchen.

Im übrigen verweisen wir auf den vom Nationalen Referenzzentrum des Robert-Koch-Instituts empfohlenen Stufenplan der EHEC-Diagnostik (Lit. 15).

13. Klinische Ergebnisse

13.1. Vergleichende Studie

In einer klinischen Studie wurde der RIDASCREEN® Verotoxin Test mit insgesamt 223 Stuhlproben nach Anreicherung untersucht; 221 dieser Proben wurden zusätzlich direkt als verdünnte Suspension des Nativstuhls im Test eingesetzt. Als Referenzmethode wurde in dieser Studie ein Zytotoxizitätstest auf Verozellen herangezogen. Parallel dazu wurde der RIDASCREEN® EIA aber auch mit einem anderen, vom Paul Ehrlich Institut zugelassenen und kommerziell erhältlichen Verotoxin Enzymimmunoassay verglichen.
Die Ergebnisse der Untersuchung von Überständen aus Anreicherungskulturen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Überstände wurden für den Zytotoxizitätstest 1:5 verdünnt. Bei den beiden Enzymimmunoassays wurde entsprechend der Vorschrift des jeweiligen Herstellers verfahren.

Tab. 1: Ergebnisse des RIDASCREEN® EIA mit Überständen von Anreicherungskulturen

		RIDASCREEN® EIA (nach Anreicherung)		anderer EIA (nach Anreicherung)	
		+	-	+	-
Zytotoxizitätstest * (nach Anreicherung)	+	24	6	22	8
	-	3	190	3	190

* aus einer Probe, die vom Zytotoxizitätstest nicht positiv erkannt wurde, konnte ein VTEC isoliert werden; diese Probe wurde bei der Berechnung der Sensitivität und Spezifität als positiv berücksichtigt

Sensitivität:	80,6 %	Sensitivität:	74,1 %
Spezifität:	99,0 %	Spezifität:	99,0 %

Die Ergebnisse der Untersuchung von nativen Stuhlproben im EIA ohne Anreicherung sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Als Standardmethode wurde der Zytotoxizitätstest aus Anreicherungskulturen durchgeführt. Die Stuhlproben wurden für den Zytotoxizitätstest und den RIDASCREEN® EIA 1:5 in TSB-Medium verdünnt. Bei dem anderen Enzymimmunoassay wurde entsprechend der Vorschrift des Herstellers verfahren.

Tab. 2: Ergebnisse des RIDASCREEN® EIA mit nativen Stuhlproben

		RIDASCREEN® EIA (aus nativem Stuhl)		anderer EIA (aus nativem Stuhl)	
		+	-	+	-
Zytotoxizitätstest * (nach Anreicherung)	+	9	19	11	17
	-	3	190	1	192

* aus einer Probe, die vom Zytotoxizitätstest nicht positiv erkannt wurde, konnte ein VTEC isoliert werden; diese Probe wurde bei der Berechnung der Sensitivität und Spezifität als positiv berücksichtigt

Sensitivität:	31,0 %	Sensitivität:	37,9 %
Spezifität:	98,4 %	Spezifität:	99,5 %

Bei der Untersuchung von nativen Stuhlproben im Zytotoxizitätstest ohne Anreicherung wurde eine ähnlich niedrige Sensitivität gefunden (Ergebnisse nicht dargestellt). Diese Ergebnisse zeigen, dass der direkte Nachweis von Verotoxin in

Stuhlproben ohne vorhergehende Anreicherung des Keimes wegen zu geringer Sensitivität als Routinemethode nicht ausreichend ist.

13.2. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des RIDASCREEN® Verotoxin Tests wurde mit der eines anderen zugelassenen Verotoxin EIAs verglichen. Hierzu wurden partiell aufgereinigte Kulturüberstände definierter Stämme, die entweder VT 1 oder VT 2 produzieren, in Verdünnungsreihen in den jeweiligen Verdünnungspuffern der Tests seriell verdünnt und die Extinktion gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Da bisher keine Referenzstandards für die Verotoxine verfügbar sind, wurde auf eine Angabe der Proteinkonzentration der Präparationen verzichtet.

Tab. 3: Analytische Sensitivität des RIDASCREEN® Verotoxin EIAs

Verdünnung	VT 1		VT 2	
	RIDASCREEN®	anderer EIA	RIDASCREEN®	anderer EIA
1: 300	2,38	2,10	3,35	2,40
1: 900	1,07	1,33	2,95	1,99
1: 2.700	0,47	0,54	3,00	1,38
1: 8.100	0,35	0,18	1,65	0,81
1: 24.300	0,20	0,06	0,54	0,23
1: 72.900	0,10	0,05	0,20	0,06
1: 218.700	0,08	0,05	0,12	0,05

	RIDASCREEN®	anderer EIA
Pos.-Kontrolle:	2,83	1,64
Neg.-Kontrolle:	0,07	0,05
Grenzwert:	0,17	0,18

13.3. Spezifität

Relevante Keime wurden über Nacht in Anreicherungsmedium bei 37 °C bebrütet und die Kulturen, die mehr als 10^6 Keime/ml enthielten, wurden nach Testvorschrift auf ihre Reaktion im ELISA überprüft (Tab. 5).
Weiterhin wurden folgende Keime während der klinischen Studie aus Proben isoliert, die im RIDASCREEN® Verotoxin keine Reaktion zeigten (Tab. 4):

Tab. 4: Spezifität des RIDASCREEN® Verotoxin Tests

Mikroorganismus
Campylobacter jejuni
Candida albicans
Clostridium difficile
Cryptosporidium
Giardia lamblia
Proteus
Salmonella typhimurium
Salmonella enteritidis
Staph. aureus
Yersinia enterocolitica
Adenovirus
Rotavirus

Tab. 5: Spezifität des RIDASCREEN® Verotoxin Tests

Mikroorganismus	OD_{450nm} - OD_{620nm}
Acinetob. lwoffii DSM 2403	0,001
Aeromonas hydrop. anaerogenes DSM 30188	0,002
Aeromonas hydrop. hydrophila DSM 30016	0,000
Citrob. freundii*	0,000
Citrob. freundii DSM 30039	0,006
Enterob. cloacae DSM 30054	0,005
Enterococcus faecalis DSM 2570	0,010
Enterococcus faecium ATCC 27164	0,009
E. coli*	0,002
E. coli*	0,002
E. hermanii DSM 4560	0,005
Lactococcus lactis DSM 20481	-0.005
Listeria innocua*	-0,008
Proteus mirabilis DSM 788	0,004
Proteus mirabilis DSM 4479	-0,005
Proteus vulgaris DSM 30119	-0,007
Providencia stuartii DSM 6676	-0,003
Pseudom. aerug. DSM 939	0,014
Pseudom. fluorescens DSM 4358	0,006
Pseudom. fluorescens DSM 50124	0,008
Salmonella Agona*	0,017
Salmonella Braenderup*	-0,003
Salmonella infantis*	-0,005

Salmonella Ohio*	0,001
Salmonella typhimurium*	0,000
Serratia proteamaculans DSM 4487	0,005
Shigella flexneri DSM 4782	0,008
Shigella sonnei DSM 5570	-0,006
Staph. aureus DSM 20372	0.042
Staph. aureus*	-0.004
Strep. agalactiae*	-0,003
Strep. dysgalactiae*	-0,001
Strep. uberis*	0,001
E. coli 026:H8 VT1	2,196
Positiv-Kontrolle E. coli VT 1+2 (0157:H7)	2,401
Negativ-Kontrolle (mTSB)	0,004
Positiv-Kontrolle (Testkit)	2,008
cut-off	0,104

* Isolat

13.4. Reproduzierbarkeit

Die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit wurde mit Verotoxin 1- und 2-Präparationen (VT 1 und VT 2) in 4 verschiedenen Konzentrationen durch jeweils 24-malige Messung ermittelt. Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient werden angegeben.
Die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit wurde mit Verotoxin 1- und 2-Präparationen (VT 1 und VT 2) in 4 verschiedenen Konzentrationen durch jeweils 11-malige unabhängige Messung ermittelt (3 Testkit-Chargen, 5 Techniker an 7 verschiedenen Tagen). Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient werden angegeben (je Probe 11 Bestimmungen). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6: Reproduzierbarkeit des RIDASCREEN® Verotoxin EIA

	negativ	schwach positiv	positiv	stark positiv
Intra-Assay VT 1				
Mittelwert Extinktion	0,05	0,651	1,227	1,887
Standardabwechung	0,009	0,046	0,058	0,101
Variationskoeffizient (%)	17,93	7,06	4,75	5,37
Intra-Assay VT 2				
Mittelwert Extinktion	0,06	0,869	1,646	2,472
Standardabweichung	0,008	0,053	0,08	0,063
Variationskoeffizient (%)	13,46	6,1	5,07	2,53
Inter-Assay VT 1				
Mittelwert Extinktion	0,056	0,626	1,192	2,105
Standardabweichung	0,008	0,092	0,105	0,111
Variationskoeffizient (%)	14,80	14,70	8,80	5,29
Inter-Assay VT 2				
Mittelwert Extinktion	0,056	0,602	1,157	2,088
Standardabweichung	0,008	0,051	0,094	0,133
Variationskoeffizient (%)	14,80	8,41	8,15	6,37

RIDASCREEN® Verotoxin

Enzyme immunoassay for the detection
of Verotoxin 1 and 2

1. Intended use

The RIDASCREEN® Verotoxin test is an in vitro diagnosticum for the detection of Verotoxin 1 and 2 (shiga-like toxins I and II) of Escherichia coli from stool specimens and from enrichment media cultures.

2. General

Enterobacteriacea of the species E. coli are part of the healthy intestinal flora of humans, as well as many farm animals. Therefore, they are indicators of fecal contamination of water and food. They are gram-negative, facultative anaerobic bipolar bacteria which are mobile due to peritrical flagellation. Because of O-antigens (LPS of the outer membrane) and H-antigens (flagella antigens) E. coli can be divided into several serotypes.
Due to different pathogenicity factors which are often plasmid-coded or transmitted by phages, E. coli have to be considered as facultative pathogenic. Since 1977, E. coli are known which are able to produce two cytotoxins, Verotoxin 1 and 2. The genes for these Verotoxins (VT) are located on the chromosome in the area of a prophage. E. coli have been isolated which contained both genes or just one. Due to the similarities of the Verotoxins to the shiga toxin of Shigella dysenteriae, they have also been labeled as the shiga-like toxin I and II (SLT-I and -II). A part of these Verotoxin forming E. coli (VTEC) can cause severe hemorrhagic diarrhea which are caused by the formation of further pathogenicity factors. The ”prototype” of these enterohemorrhagic E. coli (EHEC) was first described in 1982; it belongs to the serotype 0157:H7. In the meantime, EHEC of different O-serotypes have been described. Important additional pathogenicity factors which characterize the EHEC type are a plasmid-coded enterohemolysine and an in-

timin-adhesin. Its gene (eae A) together with genes of other virulence factors is located on a pathogenicity island (PAI) on the chromosome.
The clinical symptoms which are caused by EHEC range from light to severe gastroenteritis and to hemorrhagic colitis which occurs in 10 - 20 % of all infections. With the formation of a hemolytic-uremic syndrome (HUS) or a thrombotic-thrombocytopenic purpura (TTP), it can lead to life-threatening and post-infectious complications in 5 - 10 % of the infections, especially in infants and small children, but also in the elderly and patients with a weakened immune system. The lethal effect of HUS and TTP is especially high (approx. 10 - 15 %) for children. It can come to an acute kidney failure with the need for a temporary dialysis, but it can also cause an irreversible loss of kidney functions resulting in constant dialysis. The distinction of the clinical picture is, on the one hand, dependent on the predisposition of the patient and on the other hand it is also dependent on the corresponding EHEC phenotype. This means that the development of the illness also depends on different expressions of the pathogenicity factors. Even today, unknown factors play a role.
The incubation period is depending on the degree of infection and can range from 1 to 3 days and can extend to 8 days. Due to its high environmental resistance and a relative acid tolerance, the infection level for EHEC lies around 100 bacteria. Main sources of infection are products from cattle, sheep and goats, especially raw and insufficiently cooked meat and meat products and non-pasteurized milk. But also chains of infection from human to human, especially in public institutions such as child care centers, senior citizen homes or hospitals, as well as direct contact to animals are of importance. Clinically asymptomatic excretors have also been detected in the environment of patients.
Some of the common diagnostic methods of an EHEC infection seem to have disadvantages. Since only 1 % of E. coli, which do not belong to the group of EHEC, possess the ability to form an enterohemolysine, the detection of enterohemolytical coli bacteria on blood agar is certainly an important indicator of EHEC. But there also exist EHEC which have been isolated from HUS patients and did not produce an enterohemolysine. In addition, it has been shown that the first found type O157 is only responsible for 70 - 80 % of the HUS cases in Germany. In cases of pure gastroenteritis other serotypes dominate. Therefore, a sole detection of the serotype O157 is not sufficient. Today's recommended procedure in the diagnosis consists of an enrichment of the pathogen overnight in mTSB-medium (Mitomycin C-addition, 50 ng/ml) with subsequent isolation. To prove the safest pathogenic factor, a verotoxin detection should be carried out from culture at the same time. This can occur immunologically with ELISA or by detection of a cytopathic effect on a verocell culture (cytotoxicity assay). In comparison to the cytotoxicity assay, the ELISA technique like the RIDASCREEN® Verotoxin EIA offers a simple method which is practicable in every laboratory. An enrichment of the

bacteria is required for both methods since their excretion as well as the toxin content in the stool can be very low. Especially in HUS and TTP patients, the excretion can have ceased completely.
To get an early result, one can attempt a toxin detection directly from the stool sample without an enrichment in some cases. Due to the low sensitivity of this procedure, a negative result can only be interpreted as preliminary. It is recommended to wait for the result of enrichment.
As a therapy for HUS or TTP, a symptomatic treatment can only be recommended. This usually consists of a forced diuresis and a plasmapheresis. In the case of a total kidney insufficiency, a hemo- or peritoneal dialysis results. An antibacterial chemotherapy is generally not called for, since hereby the bacteria excretion is extended and the toxin formation is even stimulated.

3. Test principle

This test is an enzyme immunoassay (ELISA). On the surface of the microwell strips, monoclonal antibodies against Verotoxin 1 and 2 are bound. Samples and controls are pipetted into the wells and then incubated at room temperature. After a washing step monoclonal antibodies conjugated to horseradish peroxidase are added and incubated at room temperature.
If it is present, Verotoxin is sandwiched between the solid phase and enzyme-linked antibodies.
Unbound HRP-conjugate is removed by washing. Substrate/Chromogen is added to the wells and incubated at room temperature. The enzyme bound in the wells converts the colorless Substrate/Chromogen to a blue color. Addition of Stop Solution converts the color from blue to yellow. The absorption is measured at 450 nm wavelength (optional reference wavelength $\geq$ 600 nm). The intensity of the color is directly proportional to the concentration of antigen in the sample.

4. Reagents provided

The reagents in one package are sufficient for 96 determinations.
Each test kit contains:

1 x 12 Microwell Strips with 8 wells each (divisible) in a frame;
coated with monoclonal Ab (mouse) against Verotoxin 1 and 2;
in a resealable foil bag
1 x Verotoxin Sample Diluent Buffer (55 ml);
75 mM phosphate buffer; pH 7.4; ready to use
1 x Washing Buffer (100 ml; 10x conc., brown lid);
pH 7.2, contains 0.1 % Thimerosal

1 x Positive Control (1.8 ml); .....Reagent 3
inactivated Verotoxins, ready to use
1 x Enzyme Conjugate (10 ml); ..... Reagent 4
HRP-conjugated monoclonal Ab (mouse)
against Verotoxin 1 and 2, ready to use;
dyed green
1 x Substrate/Chromogen (10 ml);
peroxide/TMB, ready to use
1 x Stop Solution (6 ml); ..... Reagent C
1 N sulfuric acid
1 x Instructions for use

5. Reagents required but not provided

5.1 Reagents

- Distilled or deionized water

5.2 Accessories

- RIDA® Enrichment Bouillon (Art No.: Z 1000)
- Transfer-Pipets (Art. No.: Z 0001)
- Vortex mixer
- Micropipet for different volumes 50 – 100 µl
- Microplate washer or multichannel pipet
- Microplate reader (450 nm, optional reference wavelength ≥ 600 nm)
- Absorbent paper

6. Warnings and precautions for the users

The Positive Control contains inactivated Verotoxin. However, the Positive Control as well as the patient samples should be considered potentially contagious and be treated with the necessary safety precautions.

The Washing Buffer contains 0.1 % Thimerosal. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.

Urea peroxide can cause cauterization. Handle with care!

The Stop Solution contains 1 N sulfuric acid. Avoid contact with skin and clothing!

All reagents and materials coming in contact with potential infectious specimens must be treated with disinfectants or autoclaved at 121 °C for at least one hour.

An exchange of individual reagents between kits of different lot numbers is not possible.

Microtiterstrips and reagents should not be used if pouch is damaged or vials are leaking.

7. Storage instructions

All reagents have to be stored at 2 – 8 °C and can be used up to the expiry date printed on the labels. Microbial contamination has to be avoided. A quality warranty cannot be given beyond the kit expiration date.
The diluted Washing Buffer has a shelf life of 4 weeks if stored at 2 – 8 °C.
Allow reagents and Microwell Strips to get room temperature before use. To avoid moisture within the strips, do not take the strips out of the foil bag before having reached room temperature. The foil bag should be opened with a pair of scissors without detaching the fastener. Return any unused strips to the foil bag, reseal and store them directly at 2 – 8 °C.
The colorless Substrate/Chromogen must be protected from exposure to direct light to avoid deterioration or coloration by autoxidation. If the Substrate/ Chromogen turns blue, the reagent should be discarded.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

The following criteria may indicate a reagent deterioration:

- a turbidity or a blue coloration of the Substrate/Chromogen prior to its use
- an absorbance value of the Negative Control at 450 nm $\geq$ 0.25
- an absorbance value of the Positive Control at 450 nm $<$ 0.8

9. Specimen collection and storage

Stool samples should be taken during the acute phase of a gastroenteritis or hemorrhagic colitis. The samples should be used as freshly as possible and within 24 h. A prolonged preservation of the samples is possible at 2 – 8 °C for three days. Freezing should be avoided as the EHEC-bacteria were damaged and will not be able to grow in the enrichment media thereafter. But Verotoxin is throughout detectable after freezing if it was already present before freezing in sufficient quantity. Repeated thawing and freezing should be avoided.

If the environment is examined, stool samples of clinically unobtrusive contact persons should be taken so that asymptomatic carriers can be identified.

10. Test procedure

10.1. Preliminary comments

The test should be used only by experienced laboratory personal. Please refer to guidelines for safety regulations in medical laboratories. The test protocol must be followed strictly.
Bring all reagents and the Microwell Strips to room temperature before use. Mix the reagents well before use. Reproducibility in any EIA depends on exact pipetting, the observance of incubation times and temperature and the consistency of wash sequences. During the washing steps, take care that all wells are filled with buffer and that the liquid is completely removed from the wells. Do not allow microwells to dry between steps.
Avoid direct sunlight during all incubations. Covering the microtiter plate is recommended.
Except the Washing Buffer, all reagents are ready to use.

10.2. Preparation of the Washing Buffer

1 part of the concentrated Washing Buffer is diluted with 9 parts of distilled water. Crystals in the buffer concentrate can be dissolved in a water bath at 37 °C. The diluted Washing Buffer has a shelf life of 4 weeks if stored at 2 – 8 °C.

10.3. Preparation of the samples

To obtain an early result, a direct toxin detection should be carried out from a stool sample. Due to a possible very low toxin content in stool, a negative result cannot be taken as proof for a negative EHEC diagnosis.
To gain a sufficient sensitivity, the toxin detection is generally to be carried out after a cultural enrichment also in case of a negative result from stool. The enrichment overnight in a shaker culture at 37 °C in mTSB medium with Mitomycin C addition (50 ng/ml) is recommended.
Other media like BRILA or GN-Broth can be used for enrichment and do not influence the test but they are not in accordance with the recommended enrichment medium of the trade association.

10.3.1. Testing of fresh or frozen stool samples

Stool samples are diluted 1:5 (v/v) in Verotoxin Sample Diluent Buffer. Draw about 1 ml of liquid stool into a Pasteur pipet (Transfer-Pipet Art. No. Z 0001) and sus-

pend in 4 ml of the Buffer. If the stool is solid, take an equivalent amount with a blade. Homogenize sample by aspiration and ejection with the Transfer-Pipet or by mixing very thoroughly on a vortex-mixer. After allowing a short time to settle (10 min. clearance by sedimentation) 100 µl stool suspension will be used directly in the test.

Remark:
Due to the low sensitivity, the detection in stool samples without enrichment should only be done in urgent cases to get a fast result. A negative result is not expressive. In this case, it should be waited for the result of testing from the enrichment.

10.3.2. Testing of samples from an enrichment culture

The described proceeding corresponds to the recommendations of the RKI (Robert-Koch-Institut) and BGVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin).
Please note also the test procedure of the RIDA® Enrichment Bouillon (Art.-No. Z 1000).
The supernatant of an enrichment culture (RIDA® Enrichment Bouillon) can be applied directly to the test after a short time of centrifugation.

Remark:
Please draw attention to the temperature of bouillon and Negative Control (both should be adapted to room temperature up to 25 °C in maximum at the beginning of the test). Otherwise, increased bouillon temperature may cause false positive OD-values.

Transfer 100 µl of liquid stool samples or an adequate quantity (50 – 100 mg) of solid stool samples into 4 ml mTSB with Mitomycin C (e. g. RIDA® Enrichment Bouillon, Art. No. Z 1000) and incubate it for 18 hours up to 24 hours by shaking (approx. 120 - 160 rpm) and under sufficient supply of oxygen at 37 °C. Horizontal shakers and rotation mixers are suitable for shaking.
After incubation the complete sample should be centrifuged for 15 minutes at 3000 rpm. 100 µl of the supernatant will be used in the ELISA test.

The sediments as well as the original stool specimens have to be stored in case of a later confirmation. The adequate preservation will be effected by a absorption of the sediment with a swab and its transfer to the Stuart- or Cary Blair medium and storage at 2 – 8 °C up to the dispatch for confirmation by a reference lab in case of a positive ELISA-result.

10.4. First incubation

After a sufficient number of wells for samples and controls have been placed into the microwell holder, 2 drops (approx. 100 µl) of the samples (supernatant of the enrichment bouillon or stool suspension), Positive Control (Reagent 3) and Negative Control (Verotoxin Sample Diluent Buffer) are pipetted into separate wells and incubated at room temperature for 60 minutes.

10.5. Washing

Decant or aspirate all wells into a waste container with a disinfectant. Ensure complete removal of the liquid from the wells by tapping the inverted plate onto absorbent paper. Fill 300 µl of Washing Buffer in all wells and pour out liquid. Repeat the wash cycle four times (for a total of 5 washes).

When using a microplate washer, stool suspension should be discarded manually. During the washing, be sure that the liquid is completely sucked off. After final washing step the inverted Microwells should be firmly tapped on absorbent paper.

10.6. Second incubation

2 drops of Enzyme Conjugate (Reagent 4) are added to each well and incubated at room temperature for 30 minutes.

10.7. Washing

Washing according to point 10.5.

10.8. Third incubation

Add 2 drops of Substrate/Chromogen into each well. Incubate 15 minutes at room temperature in the dark.
Following the incubation, the reaction is stopped by adding 1 drop of Stop Solution (Reagent C) to each well. After careful mixing (soft tapping on the edge of the plate) the absorbance is measured at 450 nm (optional reference wavelength $\geq$ 600 nm) against an air blank.

Remark:
Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the Substrate/Chromogen.

Summary of the test procedure

1. Bring all reagents to room temperature
2. Pipet 2 drops of a sample, the Positive and Negative Control into the Microwells and incubate 60 minutes at room temperature
3. Discard the incubate and wash 5 times with 300 µl of Washing Buffer
4. Pipet 2 drops of Enzyme Conjugate and incubate 30 minutes at room temperature
5. Discard the incubate and wash 5 times with 300 µl of Washing Buffer
6. Pipet 2 drops of Substrate/Chromogen and incubate 15 minutes at room temperature in the dark
7. After addition of 1 drop Stop Solution spectrophotometric determination

11. Analysis

11.1. Quality Control

For quality control the Positive and the Negative Control must be run in each testing to ensure reagent stability and correct performance of the assay procedure. Controls are intended to monitor for substantial reagent failure. The assay run is correct, if the OD for the Negative Control is below 0.25 and the OD for the Positive Control is equal as or above 0.8. If the Negative Control yields absorbance values >0.25, this may indicate insufficient washing. If the expected control values are not fulfilled, please check the following before repeating the test:

- Expiration date of the reagents
- Calibration of the used instruments
- Exact test procedure
- Visual examination of kit components for signs of contamination, deterioration or leakage; substrate solution must not be used if turned blue

If the control data are not fulfilled after repeating, please contact your local distributor of R-Biopharm.

11.2. Calculation of the threshold (cut-off)

Depending on the investigated samples (supernatant of an enrichment culture or native stool sample), a different threshold must be calculated for analysis.

11.2.1. Testing of samples from an enrichment culture

The cut-off is determined by addition of 0.1 absorbance units to the measured absorption of the Negative Control.

cut-off = absorbance value of the Negative Control + 0.1

11.2.2. Testing of fresh or frozen stool samples (without enrichment)

The cut-off is determined by addition of 0.2 absorbance units to the measured absorption of the Negative Control.

cut-off = absorbance value of the Negative Control + 0.2

11.3. Interpretation

Samples are considered **positive** if the absorbance value is equal as or higher than the determined cut-off.

Samples are considered **negative** if the absorbance value is lower than the determined cut-off.

Samples, which have an absorbance value in the area of 10 % above or below the threshold, should not be considered as clearly positive or clearly negative. They should be classified as questionable. It is recommended to test these samples again.

12. Remarks about the test procedure and interpretation

The RIDASCREEN® Verotoxin EIA detects Verotoxin 1 and 2 of Verotoxin forming E. coli from stool samples or enrichment cultures. However, a connection between the height of the determined absorbance value and the occurrence or the severity of the clinical symptoms cannot be concluded. The results gained have to be interpreted in connection with the clinical picture. A positive toxin result with simultaneous identification of E. coli is considered to be the safest method for the detection of EHEC.

A positive result does not exclude the presence of other infectious pathogens.

Some EHEC strains produce just low amounts of Verotoxin. Due to the often very slight Verotoxin content of a stool sample, the direct toxin detection from stool is not sufficiently sensitive. But, a positive toxin result from the stool can, in individual cases, be a quick indication of a possible EHEC infection. On the other hand, a negative result cannot exclude an EHEC infection.

With a positive toxin detection an isolation of E. coli should be carried out in any case. Only the identification and characterization of the pathogen can link the toxin finding to clinical symptoms.

Despite an occurring EHEC infection, toxin detection from an enrichment culture can be negative. Due to the culture conditions the enrichment can be poor. Additionally, even following a successful E. coli enrichment the toxin content of the culture medium can be so low that toxin detection proves to be negative. A reason for this finding could be the low number of EHEC among the physiological E. coli flora (sometimes only one EHEC among 200 - 300 E. coli) or a cessation of the toxin production and excretion due to certain growth conditions. So it could happen that toxin detection directly from stool is proved to be (low) positive, but the detection out of the culture medium is negative.

Due to the very sensitive adjustment of the RIDASCREEN® Verotoxin ELISA, a low positive or questionable result could occur by nonspecific matrix effects with the investigation of native stool samples. For this reason, washing must be done very thoroughly when stool samples are investigated directly.

With the formation of post-infectious syndromes such as HUS and TTP, the number of EHEC in the stool can have been reduced so much that an isolation of the bacteria is no longer possible. In such a case, the Verotoxin ELISA would be also negative. Thus, it is very important to examine stool samples as early as possible during the enteritic phase.

Moreover, we would like to refer to the phased plan of the EHEC diagnostic recommended by the National Reference Center of the Robert-Koch-Insitute (Lit. 15).

13. Clinical results

13.1. Comparative study

The RIDASCREEN® Verotoxin EIA was tested in a preclinical study performed with 223 fecal samples following an enrichment culture. Additionally, 221 of these samples were tested as diluted suspension of the native stool. In this study a cytotoxicity assay on verocells was carried out as reference method. At the same

time the RIDASCREEN® Verotoxin EIA was compared with a Paul Ehrlich Institute approved commercial enzyme immunoassay for detection of verotoxins.
The results of the investigation of the supernatants from enrichment culture are shown in table 1. The supernatants were diluted 1:5 for the cytotoxicity assay. The both enzyme immunoassays were carried out according to the manufacturer's instructions.

Tab. 1: Results of the RIDASCREEN® EIA with supernatants from enrichment cultures

		RIDASCREEN® EIA (after enrichment)		other EIA (after enrichment)	
		+	-	+	-
Cytotoxicity assay * (after enrichment)	+	24	6	22	8
	-	3	190	3	190

* from one of these samples, that was not positive in the cytotoxicity assay, a VTEC could be isolated; this sample was considered positive for the calculation of sensitivity and specificity

sensitivity: 80.6 %	sensitivity: 74.1 %
specificity: 99.0 %	specificity: 99.0 %

The results of the investigation of native stool samples by EIA without enrichment are shown in table 2. As reference method the cytotoxycity assay was carried out after enrichment. The stool samples were diluted 1:5 in TSB medium for the RIDASCREEN® EIA as well as for the cytotoxicity assay. The other EIA was carried out according to the manufacturer's instructions.

Tab. 2: Results of the RIDASCREEN® EIA with native stool samples

		RIDASCREEN® EIA (with native stool)		other EIA (with native stool)	
		+	-	+	-
Cytotoxicity assay * (after enrichment)	+	9	19	11	17
	-	3	190	1	192

* from one of these samples, that was not positive in the cytotoxicity assay, a VTEC could be isolated; this sample was considered positive for the calculation of sensitivity and specificity

sensitivity: 31.0 %	sensitivity: 37.9 %
specificity: 98.4 %	specificity: 99.5 %

A similar low sensitivity was found when native stool samples were investigated by cytotoxicity assay without a previous enrichment (data not shown). These results show that a direct toxin detection in stool samples is not sufficient to be recommended as a routine method.

13.2. Analytical sensitivity

The analytical sensitivity of the RIDASCREEN® Verotoxin test has been compared to the sensitivity of an approved verotoxin test. For this purpose, partially purified culture supernatants of E. coli strains producing either VT 1 or VT 2, have been diluted serially in the corresponding sample diluents of the tests and the absorbance values have been determined. The data are shown in table 3. Since Verotoxin reference standards are not available commercially, no statement about the protein concentration of the preparations is given.

Tab. 3: Analytical sensitivity of the RIDASCREEN® Verotoxin EIA

Dilution	VT 1		VT 2	
	RIDASCREEN®	other EIA	RIDASCREEN®	other EIA
1: 300	2.38	2.10	3.35	2.40
1: 900	1.07	1.33	2.95	1.99
1: 2,700	0.47	0.54	3.00	1.38
1: 8,100	0.35	0.18	1.65	0.81
1: 24,300	0.20	0.06	0.54	0.23
1: 72,900	0.10	0.05	0.20	0.06
1: 218,700	0.08	0.05	0.12	0.05

	RIDASCREEN®	other EIA
Pos.-Control:	2.83	1.64
Neg.-Control:	0.07	0.05
cut-off:	0.17	0.18

13.3. Specificity

Relevant bacteria have been inoculated in enrichment broth and incubated at 37 °C overnight. Cultures, containing more than 10^6 bacteria per ml have been applied into the ELISA and measured according to the instructions for use (Tab. 5).

The bacteria listed in the following table 4 have been isolated in the course of the clinical study and have shown negative results with the RIDASCREEN® Verotoxin test:

Tab. 4: Specificity of the RIDASCREEN® Verotoxin test

Microorganism
Campylobacter jejuni
Candida albicans
Clostridium difficile
Cryptosporidium
Giardia lamblia
Proteus
Salmonella typhimurium
Salmonella enteritidis
Staph. aureus
Yersinia enterocolitica
Adenovirus
Rotavirus

Tab. 5: Specificity of the RIDASCREEN® Verotoxin test

Microorganism	OD_{450nm} - OD_{620nm}
Acinetob. lwoffii DSM 2403	0.001
Aeromonas hydrop. anaerogenes DSM 30188	0.002
Aeromonas hydrop. hydrophila DSM 30016	0.000
Citrob. freundii*	0.000
Citrob. freundii DSM 30039	0.006
Enterob. cloacae DSM 30054	0.005
Enterococcus faecalis DSM 2570	0.010
Enterococcus faecium ATCC 27164	0.009
E. coli*	0.002
E. coli*	0.002
E. hermanii DSM 4560	0.005
Lactococcus lactis DSM 20481	-0.005
Listeria innocua*	-0.008
Proteus mirabilis DSM 788	0.004
Proteus mirabilis DSM 4479	-0.005
Proteus vulgaris DSM 30119	-0.007
Providencia stuartii DSM 6676	-0.003
Pseudom. aerug. DSM 939	0.014
Pseudom. fluorescens DSM 4358	0.006
Pseudom. fluorescens DSM 50124	0.008

Salmonella Agona*	0.017
Salmonella Braenderup*	-0.003
Salmonella infantis*	-0.005
Salmonella Ohio*	0.001
Salmonella typhimurium*	0.000
Serratia proteamaculans DSM 4487	0.005
Shigella flexneri DSM 4782	0.008
Shigella sonnei DSM 5570	-0.006
Staph. aureus DSM 20372	0.042
Staph. aureus*	-0.004
Strep. agalactiae*	-0.003
Strep. dysgalactiae*	-0.001
Strep. uberis*	0.001
E. coli 026:H8 VT1	2.196
Positive Control E. coli VT 1+2 (0157:H7)	2.401
Negative Control (mTSB)	0.004
Positive Control (Testkit)	2.008
cut-off	0.104

* Isolate

13.4. Precision

The Intra-Assay Variation was assayed by analyzing 4 different concentrations of Verotoxin 1 and 2 (VT 1 and VT 2) antigen preparations 24 times each. Mean, standard deviation and coefficient of variation are presented.
For the Inter-Assay variation, 4 different concentrations of Verotoxin 1 and 2 (VT 1 and VT 2) antigen preparations were assayed 11 times independently (3 batches of test kits, 5 technicians on 7 days). Mean, standard deviation and coefficient of variation are presented (11 fold determination per concentration). Results are shown in table 6.

Tab. 6: Precision of the RIDASCREEN® Verotoxin EIA

	negative	low positive	positive	high positive
Intra-Assay VT 1				
Mean Absorbance	0.05	0.651	1.227	1.887
Standard Deviation	0.009	0.046	0.058	0.101
Coefficient of Variation (%)	17.93	7.06	4.75	5.37
Intra-Assay VT 2				
Mean Absorbance	0.06	0.869	1.646	2.472
Standard Deviation	0.008	0.053	0.08	0.063
Coefficient of Variation (%)	13.46	6.1	5.07	2.53
Inter-Assay VT 1				
Mean Absorbance	0.056	0.626	1.192	2.105
Standard Deviation	0.008	0.092	0.105	0.111
Coefficient of Variation (%)	14.80	14.70	8.80	5.29
Inter-Assay VT 2				
Mean Absorbance	0.056	0.602	1.157	2.088
Standard Deviation	0.008	0.051	0.094	0.133
Coefficient of Variation (%)	14.80	8.41	8.15	6.37

Appendix

Literature

1. Beutin, L. et al.: Zur Epidemiologie von Infektionen durch enterohämorrhagische E. coli (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 1993. Bundesgesundhbl. 10, 410 - 414 (1994)
2. Beutin, L.: Infektionen mit enterohämorrhagischen Escherichia coli (EHEC). Bundesgesundhbl. 11, 426 - 429 (1996)
3. Bockemühl, J. et al.: Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen Escherichia coli (EHEC) in Deutschland (1994-1995). Bundesgesundhbl. 8, 290 - 296 (1996)
4. Bockemühl, J. et al.: Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC) in Deutschland, 1996. Bundesgesundhbl. 6, 194 - 197 (1997)
5. Bülte, M.: Enterohämorrhagische E. coli-Stämme (EHEC) - Aktuell in der Bundesrepublik Deutschland? 1. Pathogenitätspotential von EHEC-Stämmen - Bedeutung als Lebensmittelinfektionserreger. (Literaturübersicht) Fleischwirtschaft 75, 1430 - 1432 (1995)
6. Bülte, M. et al.: Enterohämorrhagische E. coli (EHEC) - aktuelle Lebensmittelinfektionserreger auch in der Bundesrepublik Deutschland? 2. Nachweis von VTEC-Stämmen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs Fleischwirtschaft 76, 88 - 91 (1996)
7. Donohue-Rolfe, A. et al.: Purification of Shiga Toxin and Shiga-Like Toxins I and II by Recptor Analog Affinity Chromatography with Immobilized P1 Glycoprotein and Production of Cross-Reactive Monoclonal Antibodies. Infection and Immunity, Dec., 3888 - 3893 (1989)
8. Karch, H. et al.: Clonal Structure and Pathogenicity of Shiga-Like Toxin-Producing, Sorbitol-Fermenting Escherichia coli 0157:H^-. Journal of Clinical Microbiology 5, 1.200 - 1.205 (1993)
9. Kuntze, U. et al.: Nachweis von verotoxinbildenden E. coli-Stämmen in Rohmilch und Rohmilchkäse. Archiv f. Lebensmittelhygiene 47, 141 - 144 (1996)
10. Ritchie, M. et al.: Comparison of a Direct Fecal Shiga-Like Toxin Assay and Sorbitol-McConkey Agar Culture for Laboratory Diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection. J. of Clin. Microbiol., Feb., 461 - 464 (1992)
11. Strockbine, N. A. et al.: Characterization of Monoclonal Antibodies against Shiga-Like Toxin from *Escherichia coli*. Infection and Immunity, Dec., 695 - 700 (1985)

12. Takeda, Y. et al.: Vero Toxins (Shiga-Like Toxins) Produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (Verocytotoxin-Producing *E. coli*). Microbiol. Immunol., 37 (8), 591 - 599 (1993)
13. Walterspiel, J. N. et al.: Effect of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on Extracellular Shiga-like Toxin I. Infection 20, No. 1, 25 - 29 (1992)
14. Gerritzen, A. et al.: Flüssige Vorkultur von Stuhlproben verbessert den EHEC-Toxinnachweis mit ELISA und Zytotoxizitätstest. J. Lab. Med. 22 (2), 097 - 101 (1998)
15. Fruth, A. et al.: Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohemorrhagischen Escherichia coli (EHEC). Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz 43, 310-317 (2000)