

RIDASCREEN[®] Verotoxin

Art. No.: C2201



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Anwendungsbereich

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDASCREEN® Verotoxin ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von Verotoxinen (syn. Shigatoxinen) aus einer Stuhlanreicherung in mTSB-Bouillon.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

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 gram-negative, 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 Verotoxin 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-Adhäsion, 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 Kei-

men. 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 Serovaren. 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 Anreicherungsresultat abzuwarten. Als Therapie kann bei HUS oder TTP nur eine symptomatische Behandlung empfohlen werden. Diese besteht in der Regel aus 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

Im RIDASCREEN® Verotoxin-Test werden spezifische Antikörper in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte sind monoklonale Antikörper gegen die Verotoxine 1 und 2 gebunden. Eine Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe oder der Überstand einer Übernacht-Anreicherung der Stuhlprobe in mTSB-Bouillon sowie die Kontrollen werden zusammen mit den biotinylierten Anti-Verotoxin-Antikörpern (Konjugat 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) zur Inkubation in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte

pipettiert. Nach einem Waschschrift wird Poly-Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Konjugat 2) dazu gegeben und erneut bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert. Bei Anwesenheit von Verotoxinen in der Probe bildet sich ein Sandwich-Komplex aus immobilisierten Antikörpern, Verotoxinen, den biotinylierten Anti-Verotoxin-Antikörpern und dem an das Biotin gebundenen Poly-Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Nicht gebundenes Poly-Streptavidin-Peroxidase-Konjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration der in der Probe vorhandenen Verotoxine.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen

Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte, 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen Verotoxin 1 und 2
Diluent 1	100 ml	Probenverdünnungspuffer, Protein-gepufferte NaCl-Lösung; gebrauchsfertig; blau gefärbt
Wash	100 ml	Waschpuffer, Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (10fach konz.); enthält 0,1%Thimerosal
Control +	2 ml	Positivkontrolle; inaktivierte Verotoxine; gebrauchsfertig
Control -	2 ml	Negativkontrolle (Probenverdünnungspuffer); gebrauchsfertig
Conjugate 1	13 ml	Biotin-konjugierte Antikörper gegen Verotoxin 1 und 2 in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; lila gefärbt
Conjugate 2	13 ml	Poly-Streptavidin-Peroxidase Konjugat in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; orange gefärbt
Substrate	13 ml	Wasserstoffperoxid/TMB; gebrauchsfertig
Stop	12 ml	Stopp-Reagenz; 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 – 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 – 8 °C 4 Wochen haltbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. 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 ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufär-

bung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

6.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

6.2. Zubehör

- RIDA[®] Anreicherungsbouillon (Art. Nr. Z1000)
- Einwegpipetten (Art. Nr.: Z0001)
- Vortex Mixer (optional, siehe 9.3.)
- Mikropipette für 50 – 100 µl und 1 ml Volumina
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter 620-650 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter mit einer 0,5%igen Hypochloritlösung

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

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.

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

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren, Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Proben Einmal-Handschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In den Bereichen, in denen mit den Proben oder den Test-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

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

Wasserstoffperoxid kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben!

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

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden. VORSICHT: Um die Bildung giftiger Gase zu vermeiden, muss Flüssigabfall, der Stoppreagenz enthält, neutralisiert werden, bevor er in eine Hypochloritlösung gegeben wird.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Die auf Verotoxine zu prüfenden Stuhlproben können vor ihrem Einsatz in der Anreicherungsbouillon, sofern sie nicht frisch eingesetzt werden, wie folgt gelagert werden:

- bis 24 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 2 – 8 °C
- bis 72 Stunden bei 2 – 8 °C

Das Einfrieren der Proben ist nicht zu empfehlen, da die EHEC-Bakterien darunter leiden und in der Anreicherungskultur dann nicht mehr gut oder gar nicht mehr vermehrungsfähig sind.

Stuhlproben sind in sauberen Behältern ohne irgendwelche Zusätze zu sammeln und vor Testbeginn bei 2 – 8 °C zu lagern.

Stuhlproben oder Rektalabstriche sollten nicht in Transportbehältern gesammelt werden, die Transportmedien mit Konservierungsstoffen, tierischen Seren, Metall-Ionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien enthalten, da Interferenzen mit dem RIDA-SCREEN® Verotoxin Test auftreten können.

Wenn rektale Abstriche eingesetzt werden sollen, ist darauf zu achten, dass genügend Stuhlmaterial (ca. 100 mg) zur Testdurchführung vorhanden ist.

Bei Umgebungsuntersuchungen sollten auch Stuhlproben von klinisch unauffälligen Kontaktpersonen genommen werden, um asymptomatische Träger zu identifizieren.

9. Testdurchführung

9.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte Plate auf Raumtemperatur (20 – 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch sind die Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Beutel) und die Reagenzien wieder bei 2 – 8 °C zu lagern. Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind. Ein direkter Kontakt von Proben mit den Kitkomponenten ist zur Vermeidung von Kreuzkontamination zu vermeiden. Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung sollte vermieden werden. Es wird empfohlen, die Mikrotiterplatte zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten abzudecken oder abzukleben.

9.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates **Wash** wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

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

9.3.1. Untersuchung von frischen oder tiefgefrorenen Stuhlproben

Die Stuhlprobe wird mit Verotoxin Probenverdünnungspuffer 1:11 (v/v) verdünnt. Hierfür wird mit einer Einwegpipette (Art. Nr.: Z0001) 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 Vortexmischer. Nach kurzem Stehenlassen (10 min., Klärsedimentation) werden 100 µl vom Überstand der Suspension direkt im Test eingesetzt. Erfolgt die Testdurchführung in einem ELISA-Automaten muss dieser Überstand partikelfrei sein. In diesem Fall empfiehlt sich eine Zentrifugation bei 2500 x g für 5 Minuten.

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.

9.3.2. Untersuchung von Proben aus der Anreicherungskultur

Die hier beschriebene Vorgehensweise entspricht den Empfehlungen des RKI (Robert-Koch-Institut) und des BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). Bitte beachten Sie auch die Testanleitung zur RIDA® Anreicherungsbouillon (Art.-Nr. Z1000). 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 Raumtemperatur (20 – 25 °C) adaptiert sein) 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. Z1000) übertragen und bei ausreichender Sauerstoffzufuhr (halbe Dreheung des Drehverschlusses) in Schräglage bei 37 °C für 18 bis maximal 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wird die gesamte Probe für 5 min bei 2500 x g zentrifugiert. Vom klaren 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 ein geeignetes Transportmedium (Amies, Stuart oder Cary-Blair) und Lagerung bei 2 – 8 °C bis zum Versand.

9.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden 100 µl der Positiv-Kontrolle **Control | +**, der Negativkontrolle **Control | -**, der Anreicherungskultur (oder gegebenenfalls der Stuhlprobensuspension) in die Vertiefungen pipettiert. Anschließend werden 100 µl des Biotin-konjugierten Antikörpers **Conjugate | 1** zugegeben und nach Durchmischung (leichtes Tippen an den Plattenrand) für 60 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

9.5. Waschen

Sorgfältiges Waschen ist wichtig zur Erzielung korrekter Ergebnisse und sollte daher strikt nach Anleitung erfolgen. Das Inkubat in den Kavitäten sollte zunächst in einen Abfallbehälter entleert und gemäß den behördlichen Vorschriften entsorgt werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

Bei der Verwendung von Waschautomaten oder ELISA-Vollautomaten ist die korrekte Einstellung des Gerätes zu beachten bzw. beim Hersteller zu erfragen. Geräte, die R-Biopharm liefert, sind bereits mit validierten Einstellungen und Arbeitsprotokollen programmiert. Um Verstopfungen von Waschnadeln zu vermeiden sollten gemäß der Probenvorbereitung (Pkt. 9.3.) nur partikelfreie Stuhlsuspension eingesetzt werden. Bei den Waschschritten muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden.

9.6. Zweite Inkubation

100 µl des Poly-Streptavidin-Peroxidase-Konjugates **Conjugate | 2** werden in die Kavitäten pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

9.7. Waschen

Waschen gemäß Pkt. 9.5.

9.8. Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl Substrat **Substrate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm gemessen (optional: 450/ 620 nm). Der Abgleich des Nullwertes sollte gegen Luft - also ohne Mikrotiterplatte - erfolgen.

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

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positiv- und Negativ-Kontrolle mitzuführen, um Reagenzien-Stabilität und korrekte Testdurchführung sicherzustellen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (O.D.) der Negativ-Kontrolle bei 450 nm kleiner 0,2 (kleiner 0,160 bei 450/620 nm) und der gemessene Wert der Positiv-Kontrolle bei 450 nm oder bei 450/620 nm größer 0,8 ist. Ist der Wert der Negativkontrolle größer 0,2 (0,160) kann dies ein Zeichen für ungenügendes Waschen sein. Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein. Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläuliche verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm Distributeur.

11. Auswertung und Interpretation

11.1. Berechnung des Grenzwertes

Für beide Arten des Untersuchungsmaterials (Überstand aus Anreicherungskultur bzw. native Stuhlprobe) wird für die Auswertung des Tests dieselbe cut-off-Berechnung zugrunde gelegt.

$$\text{cut-off} = \text{Extinktionswert der Negativ-Kontrolle} + 0,150$$

11.2. Testergebnis

Als **positiv** werden solche Proben beurteilt, deren Extinktionswert mehr als 10 % über dem errechneten Grenzwert liegt.

Als **grenzwertig** und zu wiederholen werden solche Proben bezeichnet, deren Extinktionswert im Bereich von 10 % oberhalb und unterhalb des Grenzwertes liegt. Fällt eine Wiederholungsuntersuchung mit einer frischen Stuhlprobe wieder in den Graubereich, so ist die Probe als negativ zu beurteilen.

Proben, die mehr als 10 % unter dem errechneten Grenzwert liegen, sind als **negativ** zu bewerten.

12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® Verotoxin-Test weist die Verotoxine 1 und 2 von verotoxinbildenden *E. coli* in Stuhlproben oder aus Anreicherungskulturen 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.

Ein **negatives** Ergebnis schließt eine mögliche Infektion mit Verotoxin bildenden *E. coli* nicht aus. Es kann durch intermittierende Ausscheidung des Erregers oder zu geringe Antigenmenge in der Probe verursacht sein. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine Infektion mit Verotoxin bildenden *E. coli*, sollte eine weitere Stuhlprobe untersucht werden.

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.

Ein **grenzwertiges** Ergebnis kann durch eine inhomogene Verteilung der Bakterien in der Stuhlprobe verursacht werden. Deshalb sollte in einem solchen Fall eine zweite Suspension aus der gleichen Probe untersucht werden oder eine weitere Stuhlprobe zur Untersuchung angefordert 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 auch aus einer Anreicherungskultur negativ ausfallen. In Abhängigkeit von den Kulturbedingungen kann die Anreiche-

rung 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. Leistungsmerkmale

13.1. Testqualität

In einer Validierungsstudie mit dem RIDASCREEN® Verotoxin ELISA wurden 94 Proben untersucht. Bei den Proben handelte es sich um in mTSB-Bouillon angereicherte Stuhlproben aus einem deutschen Routinelabor die nach ihrer dortigen Routineuntersuchung für die Validierung des RIDASCREEN® Verotoxin ELISA gefroren asserviert wurden. Nach Auftauen wurden die Proben dann vergleichend im RIDASCREEN® Verotoxin ELISA und zwei weiteren kommerziellen ELISA untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Korrelation zwischen dem RIDASCREEN® Verotoxin ELISA und zwei weiteren kommerziellen ELISA-Tests

		ELISA 1		ELISA 2	
		positiv	negativ	positiv	negativ
RIDASCREEN® Verotoxin	positiv	35	4	34	5
	negativ	0	55	0	55

Positive Übereinstimmung:	94,6 %	93,2 %
Negative Übereinstimmung:	96,5 %	95,7 %

13.2. Kreuzreaktivität

Verschiedene pathogene Keime wurden mit dem RIDASCREEN® Verotoxin ELISA untersucht und zeigten bis aus *S. aureus* keine Kreuzreaktivität. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit Bakteriensuspensionen, die eine Konzentration von 10^6 bis 10^9 Organismen pro ml aufwiesen. Viruskulturüberstände sind entsprechend deklariert.

S. aureus wurde in einer Konzentration von $\sim 6,3 \times 10^7$ KBE/ml in den Test eingesetzt und zeigte bei 2 der 3 Replikate schwach positive Ergebnisse. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 2: Kreuzreaktionen mit pathogenen Mikroorganismen

Testkeim	Herkunft	Mittelwert [OD450/620]
Adenovirus	Zellkulturüberstand	-0,006
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Kultur	0,043
Astrovirus	Zellkulturüberstand	0,000
<i>Bacillus cereus</i>	Kultur	-0,001
<i>Bacteroides fragilis</i>	Kultur	0,002
<i>Campylobacter coli</i>	Kultur	0,021
<i>Campylobacter jejuni</i>	Kultur	0,028
<i>Candida albicans</i>	Kultur	0,006
<i>Citrobacter freundii</i>	Kultur	-0,005
<i>Clostridium difficile</i>	Kultur	-0,004
<i>Clostridium perfringens</i>	Kultur	-0,001
<i>Clostridium sordellii</i>	Kultur	0,056
<i>Cryptosporidium muris</i>	Kultur	-0,001
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Kultur	-0,001
<i>Entamoeba histolytica</i>	Kultur	0,003
<i>Enterobacter cloacae</i>	Kultur	0,003
<i>Enterococcus faecalis</i>	Kultur	0,005
<i>Escherichia coli</i>	Kultur	-0,007
<i>Escherichia coli</i>	Kultur	-0,001
<i>Escherichia coli</i>	Kultur	-0,006
<i>Escherichia coli</i>	Kultur	-0,005
<i>Escherichia coli</i>	Kultur	-0,002
<i>Escherichia coli</i>	Kultur	-0,006
<i>Escherichia coli</i>	Kultur	-0,002
<i>Escherichia coli</i>	Kultur	-0,002
<i>Escherichia coli</i>	Kultur	-0,006
<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	Kultur	-0,006
<i>Escherichia coli</i> (O6)	Kultur	-0,002
<i>Giardia lamblia</i>	Stuhl	-0,001
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Kultur	0,003
<i>Proteus vulgaris</i>	Kultur	0,004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kultur	-0,004
Rotavirus	Zellkulturüberstand	0,001
<i>Salmonella enteritidis</i>	Kultur	-0,005
<i>Salmonella typhimurium</i>	Kultur	0,001

<i>Serratia liquefaciens</i>	Kultur	0,002
<i>Shigella dysenteriae</i>	Kultur	0,004
<i>Shigella flexneri</i>	Kultur	-0,002
<i>Shigella sonnei</i>	Kultur	-0,005
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kultur	0,126
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kultur	-0,003
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Kultur	-0,003
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Kultur	-0,005

13.3. Präzision

Die Reproduzierbarkeit des RIDASCREEN® Verotoxin ELISA wurde mit sechs Referenzen, die den gesamten Messbereich von schwach bis hoch positiv abdecken, durchgeführt. Zur Bestimmung der Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurden 40 Replikate dieser Referenzen gemessen. Die Mittelwerte und die Variationskoeffizienten (VK) wurden für 3 Lots ermittelt. Für die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurden die Referenzen an 10 verschiedenen Arbeitstagen mit 2 Läufen am Tag in Duplikaten gemessen. Die Messungen wurden mit 3 Lots und von 2 Technikern durchgeführt. Die Inter-Lot Reproduzierbarkeit wurde über alle 3 Lots ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Ergebnisse der Reproduzierbarkeit/Präzision des RIDASCREEN® Verotoxin ELISA

Referenz Mittelwert / VK		Intra-Assay			Inter-Assay			Inter-Lot
		Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	MW	2,387	2,021	2,374	2,371	2,098	2,448	2,306
	VK (%)	5,01%	5,91%	7,61%	9,01%	7,56%	8,76%	11,58%
2	MW	1,497	1,402	1,753	1,706	1,518	1,779	1,668
	VK (%)	5,01%	5,21%	7,40%	15,59%	8,69%	10,20%	12,67%
3	MW	0,808	0,711	0,835	0,850	0,784	0,949	0,861
	VK (%)	8,60%	10,94%	9,32%	10,85%	10,08%	12,81%	14,85%
4	MW	0,310	0,280	0,379	0,386	0,371	0,452	0,403
	VK (%)	9,15%	9,39%	13,49%	15,33%	11,71%	14,98%	17,63%
5	MW	0,200	0,190	0,302	0,224	0,223	0,278	0,242
	VK (%)	12,23%	13,40%	7,94%	21,67%	17,17%	18,22%	22,74%
6	MW	-0,003	0,002	-0,002	0,010	0,004	0,012	0,009
	VK (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

13.4 Analytische Sensitivität

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des RIDASCREEN® Verotoxin ELISA wurden LoB (Limit of Blank) mit 90 Messungen von negativen Proben (Anreicherungsbouillon) und LoD (Limit of Detection) mit 72 Messungen der beiden Toxine analysiert. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Ergebnisse der analytischen Sensitivität des RIDASCREEN® Verotoxin ELISA

	MW [OD450/620]	pg/ml
LoB	0,022	-
LoD Verotoxin 1	-	12,5
LoD Verotoxin 2	-	25,0

13.5 Interferierende Substanzen

Die nachfolgend aufgeführten Substanzen zeigten keinen Effekt auf die Testergebnisse, wenn sie in mTSB beimpft mit Verotoxin-positiven und Verotoxin-negativen Stuhlproben in den angegebenen Konzentrationen eingemischt wurden: Mucin (5 % v/v), Humanblut (5 % v/v), Bariumsulfat (18,5 % v/v), Loperamid (0,02 % w/v), Pepto-Bismol (6,6 % v/v), Stearin-/Palmitinsäure (40 % v/v), Metronidazol (3 % w/v), Diclofenac (0,1 % w/v), Cyclamat/Saccharin Mischung (1,3 % v/v).

Mucin and Bariumsulfat zeigten außerdem eine dosis-abhängige Reduktion der OD-Werte wenn sie ausgehend von oben genannten Konzentrationen verdünnt eingesetzt wurden.

Anhang

Testspezifische Symbole :

Plate	Mikrotiterplatte
Diluent 1	Probenverdünnungspuffer
Wash	Waschpuffer
Control +	Positivkontrolle
Control -	Negativkontrolle
Conjugate 1	Konjugat 1
Conjugate 2	Konjugat 2
Substrate	Substrat
Stop	Stopp-Reagenz

Literatur

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) Fleisch-wirtschaft 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 Receptor 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)