



## Gebrauchsinformation für R-Adenovirus-Antigen-ELISA

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Adenovirusantigen in respiratorischen Proben

Best.-Nr.: DS-7052  
Ausgabe: 2006-04

### 1. Einleitung

Adenoviren verursachen eine Reihe klinischer Erkrankungen, z.B. Genital-, Urogenital- und enteritische Infekte sowie Respirationstrakt- und Augeninfekte; im Falle von Immundefekten wurden generalisierte Infektionen beobachtet.

Der vorliegende Test ist für den Nachweis respiratorischer Adenovirusinfektionen vorgesehen. Adenoviren werden vorwiegend durch Tröpfcheninfektion und Schmierinfektion übertragen. Der Nasenrachenraum und die Konjunktiven stellen die Eintrittspforte dar. Die Inkubationszeit beträgt meist zwischen 2 und 10 Tagen. Die Replikation der Viren erfolgt hauptsächlich auf den Schleimhäuten der Atemwege, die hierdurch nachhaltig geschädigt werden. Die Infektion kann sich bis zur Viruspneumonie steigern und als Wegbereiter bakterieller Superinfektionen wirken. Gelegentlich auftretende Epidemien bei Menschenansammlungen z.B. in Kindergärten, Schulen oder Kasernen machen deutlich, dass der Erregernachweis auch zur Vermeidung nosokomialer Infektionen notwendig ist. Der hier beschriebene Elisa ist zum Nachweis von respiratorischem Adenovirus optimiert und stellt eine zeit- und kostengünstige Alternative zur häufig langwierigen Virusisolierung dar, die zudem nur in wenigen Speziallabors durchgeführt wird.

Die monoklonalen Antikörper des Testsystems sind gegen konservierte Epitope des Hexonproteins gerichtet.

### 2. Testprinzip

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen sind mit monoklonalen Antikörpern gegen das Hexonprotein der Adenoviren beschichtet. In der Probe bzw. Kontrolle vorhandenes Adenovirusantigen wird von diesem Fängerantikörper gebunden. Der Peroxidase-konjugierte anti-Adenovirus-Antikörper in der Detektorlösung lagert sich an das gebundene Antigen an. Durch sorgfältiges Waschen werden alle nicht gebundenen Bestandteile und überschüssiges Konjugat entfernt.

Zugegebenes farbloses TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin) wird von gebundener Peroxidase in ein blaues Reaktionsprodukt umgewandelt. Durch Abstoppen mit 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> schlägt es nach gelb um und wird photometrisch bestimmt. Der Absorptionswert ist proportional zur Antigenkonzentration.

### 3. Inhalt des Kits

Mikrotiterstreifen (in einzelne Kavitäten brechbar) im Halterahmen, 12 Stück  
beschichtet mit Antikörpern gegen Adenoviren

Waschpuffer, 10-fach konzentriert	2 x 50 ml
Detektorlösung	10 ml
Positive Kontrolle, gebrauchsfertig	2 ml
Negative Kontrolle, gebrauchsfertig	2 ml
N-Acetylcysteinlösung	2 ml
TMB-Substratlösung	10 ml
Stopplösung (2,5 M Schwefelsäure)	10 ml
Gebrauchsanweisung	1 Stück

#### 3.1 Zusätzlich benötigte Materialien

Pipetten für 10-100 µl, Pipettenspitzen  
destilliertes Wasser  
Stoppuhr

Automatisches Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette  
Filterpapier zum Trocknen der Mikrotiterstreifen nach dem Waschen  
Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzwellenlänge 620-690 nm)

### 4. Lagerung

Die Reagenzien bei 2–8°C lagern. Das Verfallsdatum ist auf den Etiketten angegeben. Die Reagenzien nicht nach Ablauf der Haltbarkeit verwenden. Die TMB-Substratlösung vor Licht schützen.

### 5. Warn- und Entsorgungshinweis

Die Reagenzien nur für in vitro Untersuchungen verwenden. Während der Testdurchführung Arbeitsschutzkleidung (Kittel, Schutzhandschuhe) tragen. Einige Reagenzien enthalten Thimerosal als Konservierungsmittel. Beim Umgang mit Produkten, die Konservierungsmittel, TMB oder Säure enthalten, Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei entsprechendem Kontakt sofort mit reichlich Wasser spülen.

Da Adenoviren eine hohe Affinität zu Zellen des Augenbereichs haben, sollte beim Umgang mit den Proben ein Hand zu Auge Kontakt unbedingt vermieden werden.

Alle Proben und bei der Testdurchführung verwendeten Materialien und Testreagenzien müssen als potentiell infektiös angesehen werden und daher vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren bei 121°C).

Reagenzien aus Kits mit unterschiedlicher Chargenbezeichnung nicht austauschen.  
Fläschchen nach Gebrauch sorgfältig verschließen.

## 6. Probennahme

Als Untersuchungsmaterial eignen sich Nasopharyngealsekret (Aspirate), Nasopharynxspülflüssigkeit, Nasopharynxabstriche und Bronchoalveoläre Lavage (BAL). Die Viruskonzentration ist in den ersten Tagen der Erkrankung am höchsten. Abstrichtupfer können in geeigneten Probengefäßen mit 0,5–1 ml steriler Kochsalzlösung (0,9%ig) oder speziellen Transportmedien zur Virusisolierung bis zur Testdurchführung aufbewahrt werden. Proben vor der Testdurchführung nicht länger als 1-2 Tage bei 2-8°C lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Probe sollte vermieden werden, weil hierdurch die Epitope zerstört werden können.

## 7. Vorbereitung der Proben und Reagenzien

Vor Testbeginn alle Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmen.

### 7.1 Mikrotiterstreifen

Den Halterahmen aus dem Beutel nehmen, nicht benötigte Kavitäten herausnehmen und zurücklegen. Den Beutel fest verschließen.

### 7.2 Waschpuffer

Das Konzentrat 1:10 mit dest. Wasser verdünnen (z.B. 1 Fläschchen Waschpufferkonzentrat in einem Meßzylinder auf 500 ml auffüllen und mischen).

Achtung: Bei Lagerung des konzentrierten Waschpuffers unter 4°C kann es zur Kristallbildung kommen. In diesem Fall das Konzentrat auf 37°C erwärmen bis es vollständig gelöst ist und erst anschließend verdünnen.

### 7.3 Probenbehandlung

Patientenproben werden unverdünnt eingesetzt. Abstrichtupfer mit 500 µl gebrauchsfertigen Waschpuffer eluieren. Eingefrorene Proben vollständig auftauen und sehr gut mischen. Besonders zähflüssige Proben werden mit der mitgelieferten N-Acetylcysteinlösung vorbehandelt. Hierzu werden 100 µl Patientenprobe + 20 µl N-Acetylcysteinlösung gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die vorbehandelten Proben werden dann wie gewohnt eingesetzt.

## 8. Testdurchführung

Nach Testbeginn die einzelnen Schritte ohne Unterbrechung durchführen.

Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden, um Verschleppung zu vermeiden.

Die Inkubationszeiten genau einhalten.

Die benötigte Anzahl Kavitäten der Verpackung entnehmen und in den Rahmen einsetzen.

- **2 Tropfen** (100 µl) Detektorlösung in jede Kavität geben.
- Je **100 µl** Probe oder **2 Tropfen** Kontrolle in die vorgegebenen Kavitäten zur Detektorlösung zugeben.
- Den Rahmen kurz schütteln, abdecken und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.

- Nach der Inkubation die Kavitäten 5 mal mit gebrauchsfertigem Waschpuffer sorgfältig waschen.  
(Pro Waschvorgang ca. 300 µl Waschpuffer in jede Kavität pipettieren und nach 10-15 Sekunden entfernen.)
- Die Kavitäten durch Ausklopfen des Rahmens auf Filterpapier trocknen.
- **2 Tropfen** (100 µl) TMB-Substratlösung in jede Kavität geben.
- Den Test 15 Minuten im **Dunkeln** bei Raumtemperatur (20–25°C) inkubieren.
- Die Reaktion durch Zugabe von **2 Tropfen** (100 µl) Stopplösung in jede Kavität beenden.
- Die Absorption (OD-Wert) jeder Kavität sofort photometrisch bei 450 nm messen (Referenzwellenlänge: 620-690 nm).

## 9. Auswertung

- **Cut-off:**  
OD-Wert (450 nm) der negativen Kontrolle + 0,100
- **Grenzwertiger Bereich:**  
Cut-off ± 10%

### Beispiel:

Negative Kontrolle	= 0,070
Cut-off	= 0,070 + 0,100 = 0,170
Grenzwertiger Bereich	= 0,170 ± 10 % = 0,153 bis 0,187

Eine Probe ist **positiv**, wenn der OD-Wert (bei 450 nm) oberhalb des grenzwertigen Bereichs liegt.

Eine Probe ist **negativ**, wenn der OD-Wert (bei 450 nm) unterhalb des grenzwertigen Bereichs liegt.

### 9.1 Kontrollen

Bei jeder Testreihe muß eine positive und eine negative Kontrolle mitgeführt werden. Die Kontrollen müssen die folgenden Kriterien erfüllen:

- Positive Kontrolle           OD-Wert bei 450 nm > 0,600
- Negative Kontrolle         OD-Wert bei 450 nm < 0,150

Werden diese Kriterien nicht erfüllt, muß der Test wiederholt werden.

## 10. Beurteilung der Ergebnisse

Liegt der Absorptionswert oberhalb des grenzwertigen Bereichs, ist die Probe als Adenovirus-positiv zu bewerten.

Liegt der Absorptionswert unterhalb des grenzwertigen Bereichs, ist die Probe als Adenovirus-negativ zu bewerten.

Ein negatives Ergebnis kann eine mögliche Adenovirusinfektion nicht ausschließen. Eine Interpretation der Ergebnisse sollte immer in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen.

Wie bei allen immunologischen Testverfahren können Verunreinigungen der Reagenzien durch Bakterien und Pilze, nicht ordnungsgemäßes Waschen, sowie die Nichteinhaltung der Inkubationszeiten während der Testdurchführung zu falschen Resultaten führen.

## 11. Leistungsdaten

Für die **Reproduzierbarkeit** innerhalb einer typischen Testcharge wurde ein Variationskoeffizient von 7,7 % bei einer OD von 1,600 bestimmt.

Die **Nachweisgrenze** wurde durch Vergleich mit einer titrierten Virussuspension (AV2) experimentell bestimmt und betrug  $3 \cdot 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml.

68 klinische Proben aus dem Respirationstrakt wurden in der PCR, in einem Vergleichs-Elisa und im ds-direct R-Adeno-Elisa untersucht. Für den ds-direct R-Adeno-Elisa wurde eine **Sensitivität** von 90 % und eine **Spezifität** von 98 % ermittelt.

**Kreuzreaktionen** mit anderen viralen und bakteriellen respiratorischen Erregern wurden bisher nicht beobachtet.

## 12. Literatur

1. T. Adrian, P. Pring-Akerblom. Adenoviren. In H.W. Doerr, W.H. Gerlich: Medizinische Virologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2002
2. M.S. Horwitz: Adenoviridae and Their Replication. In: B.N. Fields et al.: Virology, Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 1990
3. T. Heikkinen, J. Marttila, A.A. Salmi, O. Ruuskanen. 2002. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirat for isolation of respiratory viruses. 40: 4337-4339.
4. Th. Mertens, O. Haller, H.-D. Klenk. Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten: Adenoviren, Elsevier, München, 2004
5. S. Philippou, H.J. Streckert, B Khanavkar, J.A. Nakhosteen, H. Werchau, K. Morgenroth. 1993. Ultrastrukturelle Untersuchungen an der menschlichen Bronchialschleimhaut nach einer Adenovirusinfektion in vitro. Atemw.- Lungenkhh. 19: 329-332.
6. P. Pring-Akerblom. Adenoviridae. In D. Adam, H.W. Doerr, H. Link, H. Lode: Die Infektiologie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2004
7. H.K. Sarkkinen, P.E. Halonen, P.P. Arstila, A.Q. Salmi. 1981. Detection of respiratory syncytial, parainfluenza type 2, and adenovirus antigens by radioimmunoassay and enzyme immunoassay on nasopharyngeal specimens from children with acute respiratory disease. J. Clin. Microbiol. 13: 258-265.