



Gebrauchsinformation für RSV-Antigen-ELISA

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Respiratory Syncytial Virus (RSV) Antigen
in respiratorischen Proben

Best.-Nr.: DS-7056

Ausgabe: 2006-04

1. Einleitung

Infektionen mit dem Respiratory Syncytial Virus (RSV) gehören im Säuglings- und Kleinkindalter zu den häufigsten Erkrankungen der oberen und insbesondere der unteren Atemwege. Auch bei älteren Menschen, Personen mit Immundefizienz und unter Immunsuppression kann es zu Erkrankungen der unteren Atemwege kommen. Anschließend an die Erkrankung können die Atemwege für einen längeren Zeitraum hyperreagibel werden. RSV-Infektionen stehen deshalb im Verdacht, ein auslösender Faktor für spätere obstruktive Erkrankungen zu sein bzw. führen zu einer Exazerbation einer chronischen Lungenerkrankung.

Für die Übertragung des RSV spielen nach neueren Untersuchungen, der Kontakt mit Tröpfchen oder Sekreten und das anschließende Aufbringen auf die Schleimhäute der Nase und des Auges die bedeutendste Rolle. Aus diesem Grunde gehört RSV zu den verbreiteten nosokomialen Infektionen. Besonders häufig sind die pflegeintensiven Neu- und Frühgeborenenstationen betroffen; Erkrankungen des Krankenhauspersonals wurden nachgewiesen.

Der diagnostische Nachweis einer RSV-Infektion dient folglich der Vermeidung nicht-indizierter Behandlungsmethoden und kann darüberhinaus dazu beitragen, das Ausmaß nosokomialer Infektionen zu begrenzen.

2. Testprinzip

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen sind mit monoklonalen Antikörpern gegen konservierte Epitope des RSV-Fusionsproteins beschichtet. In der Probe bzw. Kontrolle vorhandene RSV-Antigene werden von diesem Fängerantikörper gebunden. Der Peroxidase-konjugierte anti-RSV-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 H₂SO₄ 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 RSV

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.

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) und Bronchoalveoläre Lavage (BAL). Nasopharynxspülflüssigkeit und Nasopharynxabstriche enthalten meist geringere Antigenkonzentrationen. Sputum und Rachenspülungen sind als Probenmaterial weniger geeignet. Abstrichtupfer können in geeigneten Probengefäßen mit 0,5–1ml 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 pipettieren.
- Je **100 µl** Probe oder **2 Tropfen** Kontrolle in die vorgegebenen Kavitäten zur Detektorlösung pipettieren.
- 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 pipettieren.
- 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 RSV-positiv zu bewerten.

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

Ein negatives Ergebnis kann eine mögliche RSV-Infektion 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 7,4% bei einer OD von 1,300 bestimmt.

Die **Nachweisgrenze** wurde durch Vergleich mit einer titrierten Virussuspension (strain-long) ermittelt und betrug $3 \cdot 10^3$ TCID₅₀/ml.

58 klinische Proben aus dem Respirationstrakt wurden in zwei Vergleichs-Testen und im ds-direct RSV-Elisa untersucht. Für den ds-direct RSV-Elisa wurde eine **Sensitivität** von 100 % und eine **Spezifität** von 98 % bestimmt.

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

12. Literatur

1. A. Capewell, J.M. Inglis, J. Williamson. 1984. Respiratory syncytial virus infections in the elderly. Br. Med. J. 288: 235-236.
2. P.L. Collins, K. McIntosh, R.M. Chanock: Respiratory Syncytial Virus. In B.N. Fields et al.: Virology, Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 1996
3. T. Heikkinen, J. Marttila, A.A. Salmi, O. Ruuskanen. 2002. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirat for isolation of respiratory viruses. J. Microbiol. 40: 4337-4339.
4. C.J. Holberg, A.L. Wright, F.D. Martinez, C.G. Ray, L.M. Taussig, M.D. Lebowitz. 1991. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. Am. J. Epidemiol. 133: 1135-1151.
5. K. McIntosh: Respiratory Syncytial Virus. In: A.S. Evans, R.A. Kaslow: Viral Infections of Humans. Plenum Medical Book Company, New York, London, 1997
6. S. Philippou, P. Otto, P. Reinhold, M. Elschner, H.J. Streckert. 2000. Respiratory syncytial virus- induced chronic bronchiolitis in experimentally infected calves. Virchows Arch. 436: 617-621.
7. RKI-Ratgeber: Erkrankungen durch Respiratory Syncytial Viren (RSV). Epid. Bull. 2002/10
8. 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.
9. F.J. Sorvillo, S.F. Huie, M.A. Strassburg, A. Hutsumyo, W.X. Shandera, S.L. Fannin. 1984. An outbreak of respiratory syncytial virus pneumonia in a nursing home for the elderly. J. Infect. 9: 252-256.
10. M. Waris, O. Meurmann, M.A. Mufson, O. Ruuskanen, P. Halonen. 1992. Shedding of infectious virus and virus antigen during acute infection with respiratory syncytial virus. J. Med. Virol. 38: 111-116.
11. J. Weigl, F. Forster et al.. 2003. Virale Atemwegsinfektionen mit saisonaler Häufung bei Kindern. Bundesgesundheitsbl. 46: 9-19.
12. C.H. Wirsing von König, M. Riffelmann. 2003. Respiratorische Kinderkrankheiten bei Erwachsenen. Bundesgesundheitsbl. 46: 20-24.