



Gebrauchsinformation für Rotavirus-Antigen-ELISA

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Rotavirusantigenen in Stuhlproben

Best.-Nr.: DS-7055

Ausgabe: 2006-04

1. Einleitung

Rotaviren sind weltweit als wichtigster Erreger schwerverlaufender Durchfallerkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern bekannt. Bei Durchfallerkrankungen, die eine Krankenhauseinweisung erfordern, sind 35 – 52 % auf Rotaviren zurückzuführen. Da verschiedene Serotypen vorkommen, sind Reinfektionen möglich. Serologische Untersuchungen zeigen, dass am Ende des dritten Lebensjahres meist mehr als 90 % der untersuchten Kinder Kontakt mit Rota hatten. Rotaviren werden üblicherweise fäkaloral übertragen. Infektiöse Partikel werden nach Erkennung oft über einen Zeitraum von 6 – 8 Tagen im Stuhl ausgeschieden. Wenn man die hohe Stabilität der Rotaviren gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen berücksichtigt, so wird deutlich, dass nosokomialen Infektionen vorgebeugt werden muss.

Ein früher diagnostischer Nachweis einer Rotavirusinfektion kann u. a. dazu beitragen, eine nicht-indizierte antibiotische Therapie und die Ausbreitung nosokomialer Infektionen zu verhindern.

Die im Test verwendeten monoklonalen Antikörper sind gegen konservierte Epitope des Gruppenantigens VP6 gerichtet.

2. Testprinzip

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen sind mit monoklonalen Antikörpern gegen das VP6 der Gruppe A Rotaviren beschichtet. In der Probe bzw. Kontrolle vorhandenes Rotavirusantigen wird von diesem Fängerantikörper gebunden. Der Peroxidase-konjugierte anti-Rotavirus-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, beschichtet mit Antikörpern gegen Rotaviren	12 Stück
Waschpuffer, 10-fach konzentriert	2 x 50 ml
Detektorlösung	10 ml
Positive Kontrolle, gebrauchsfertig	2 ml
Negative Kontrolle, gebrauchsfertig	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
Röhrchen für die Probenverdünnung
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 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 dienen Stuhlproben. Eine Probenentnahme sollte bereits nach Auftreten erster Symptome erfolgen. Die Viruskonzentration ist in den ersten Tagen der Erkrankung am höchsten. 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 1:10 in Waschpuffer verdünnt (z.B. 100 µl Probe mit 900 µl gebrauchsfertigen Waschpuffer).

Eingefrorene Proben vollständig auftauen und sehr gut mischen.

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig.

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 Rotavirus-positiv zu bewerten.

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

Ein negatives Ergebnis kann eine mögliche Rotavirusinfektion 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 5,9 % bei einer OD von 1,100 bestimmt.

Die **Nachweisgrenze** wurde durch Vergleich mit einer titrierten Virussuspension (Serotyp G1) experimentell bestimmt und betrug $5 \cdot 10^3$ TCID₅₀/ml.

180 klinische Stuhlproben wurden im Elektronenmikroskop und im ds-direct Rota-Elisa untersucht. Für den ds-direct Rota-Elisa wurde eine **Sensitivität** von 99 % und eine **Spezifität** von 100 % ermittelt.

Die im Test genutzten monoklonalen Antikörper erkennen **konservierte Epitope** des **Gruppenantigens VP6**. Die Epitope erwiesen sich bei allen getesteten humanen und animalen Virusisolaten (G1-G8 und G10) der Gruppe A Rotaviren als konserviert. Rotaviren der Subgruppe I und II werden erkannt.

Kreuzreaktionen mit anderen viralen und bakteriellen Durchfallerregern wurden bisher nicht beobachtet.

12. Literatur

1. G.L. Barnes, E. Uren, K.B. Stevens, R.F. Bishop. 1998. Etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Melbourne, Australia, from April 1980 to March 1993. J. Clin. Microbiol. 36: 133-138.
2. M.K. Estes. Rotaviruses and their replication. In B.N. Fields et al.: Virology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996
3. A.Z. Kapikian. 1993. Viral gastroenteritis. JAMA 269: 627-630.
4. A.Z. Kapikian, R.M. Chanock.. In B.N. Fields et al.: Virology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996
5. A.Z. Kapikian. Viral gastroenteritis. In A.S. Evans, R.A. Kaslow: Viral infections of humans, Plenum Medical Book Company, New York, London, 1997
6. Y. Koshimura, T. Nakagomi, O. Nakagomi. 2000. The relative frequencies of G serotypes of rotaviruses recovered from hospitalized children with diarrhea: A 10-year survey (1987-1996) in Japan with a review of globally collected data. Microbiol. Immunol. 44: 499-510.
7. Th. Mertens, O. Haller, H.-D. Klenk. Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten: Rotaviren, Elsevier, München, 2004
8. T. Nakagomi. 2000. Rotavirus infection and intussusception: A view from retrospect. Microbiol. Immunol. 44: 619-628.
9. H. Rabenau, B. Knoll, R. Allwinn, H.W. Doerr, B. Weber. 1998. Improvement of the specificity of enzyme immunoassays for the detection of rotavirus and adenovirus in fecal specimens. Intervirology 41: 55-62.
10. T. Ruuska, T. Vesikari. 1991. A prospective study of acute diarrhoea in Finnish children from birth to 2.5 years of age. Acta Paediatr. Scand. 80: 500-507.
11. H.J. Streckert. Reoviren, Rotavirus-Gastroenteritis, In W. Köhler, H.J. Eggers et al.: Medizinische Mikrobiologie, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2001
12. H.J. Streckert. Gastroenteritis-Erreger: Reo-/Rota-, Corona-, Calici-, Astroviren. In H.W. Doerr W.H Gerlich: Medizinische Virologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2002