



Gebrauchsinformation für Rotavirus-Antigen-ELISA

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Adenovirusantigenen in Stuhlproben

Best.-Nr.: DS-7055

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 von Adenovirusantigenen in humanen Stuhlproben 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 Virusausscheidung kann dem Auftreten der klinischen Symptome (Diarrhoe, Erbrechen, Fieber, Dehydratation) bereits vorausgehen. Die durchschnittliche Erkrankungsdauer liegt bei 7-10 Tagen. Gelegentlich auftretende Epidemien bei Menschenansammlungen z.B. in Kindergärten, Schulen oder Kasernen machen deutlich, daß der Erregernachweis auch zur Unterbrechung von Infektionsketten notwendig ist. Der hier beschriebene Elisa ist zum Nachweis der Hauptserotypen 31,40,41 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 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 Adenoviren

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.

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 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 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 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 $3 \cdot 10^3$ TCID₅₀/ml.

180 klinische Stuhlproben wurden im Elektronenmikroskop und im ds-direct Adeno-Elisa untersucht. Für den ds-direct Adeno-Elisa wurde eine **Sensitivität** von 97 % und eine **Spezifität** von 92 % ermittelt.

Kreuzreaktionen mit anderen viralen und bakteriellen Durchfallerregern 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. 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.
3. M.S. Horwitz: Adenoviridae and Their Replication. In: B.N. Fields et al.: Virology, Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 1990
4. A.Z. Kapikian. 1993. Viral gastroenteritis. JAMA 269: 627-630.
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. Th. Mertens, O. Haller, H.-D. Klenk. Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten: Adenoviren, Elsevier, München, 2004
7. T. Nakagomi T. 2000. Rotavirus infection and intussusception: A view from retrospect. Microbiol. Immunol. 44: 619-628.
8. P. Pring-Akerblom. Adenoviridae. In D. Adam, H.W. Doerr, H. Link, H. Lode: Die Infektiologie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2004
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.