





Serazym[®] Adenovirus

Enzymimmunoassay zum Nachweis von *Adenovirus* in Stuhlproben

REF E-017  96 REF E-017-A2  2x 96  *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Einführung

Adenoviren sind Ursache von Infektionskrankheiten der oberen (seltener auch unteren) Luftwege, folliculärer Bindehautentzündungen des Auges und von intestinalen Infektionen. Die enteralen Infektionen werden auf fäkal-oralem Weg übertragen (1). *Adenoviren* sind bei Kleinkindern für 2 - 8% respiratorischer und 7 - 17% enteraler Infektionen verantwortlich. Bei immunsupprimierten Erwachsenen werden 30% der virusbedingten Diarrhoen durch *Adenoviren* verursacht (1, 2). Da die Virusanzucht enteraler *Adenoviren* nur sehr schwer gelingt, wurde der Nachweis im Stuhl zunächst elektronenmikroskopisch geführt. Inzwischen wurden Antigennachweise auf Enzymimmunoassay-Basis entwickelt, in denen poly- und/oder monoklonale Antikörper gegen Strukturproteine, meist das Hexon als Hauptbestandteil des Viruskapsids, eingesetzt werden (3).

Literatur:

1. Mentel, R. und Döhner, L. (1996): „Humane Adenoviren.“ Diagnostische Bibliothek Band 1 Virusdiagnostik, Hrsg. Tomas Porstmann, Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien 1996, S. 103-114
2. Schoenemann W. (1988): „Bedeutung von Adenovirusinfektionen im Säuglings- und Kleinkindesalter“ Monatsschrift Kinderheilkunde 136: 680-685
3. August, M. J. and Warford, A. L. (1987): „Evaluation of a Commercial Monoclonal Antibody for Detection of Adenovirus Antigen.“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 25, No. 11: 2233-2235

Anwendungsbereich

Serazym® Adenovirus ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum direkten Nachweis von *Adenovirus* in Stuhlproben.

Testprinzip

Serazym® Adenovirus ist ein Ein-Schritt Enzymimmunoassay auf der Basis muriner monoklonaler Antikörper gegen ein Epitop des Kapsidproteins Hexon, welches in allen humanpathogenen Adenovirusserotypen nachweisbar ist. Verdünnte unbehandelte Stuhlproben und Peroxidase-(POD)-markierte monoklonale anti-Adenovirus-Antikörper werden simultan in die mit monoklonalen anti-Adenovirus-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) werden die ungebundenen Komponenten durch einen Waschschritt entfernt. Im anschließenden 10 minütigen Substratreaktionsschritt erfolgt der Nachweis Festphase-gebundener Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe durch Umsetzung der farblosen Substratlösung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Endprodukt. Diese Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die optische Dichte (OD) des Endprodukts bei 450 / \geq 620 nm ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Adenovirus-Antigene direkt proportional.

Testkomponenten

| | | | Für 96 Kavitäten | Für 2x 96 Kavitäten |
|---|-------------------------|--|--|---|
| 1 | WELLS | Mikrotiterplatte beschichtet mit monoklonalen anti-Adenovirus-Antikörpern (Maus) | 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung violett vakuumversiegelt mit Trockenbeutel | 2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung violett vakuumversiegelt mit Trockenbeutel |
| 2 | WASHBUF CONC 10x | Waschpuffer 10-fach | 100 ml Konzentrat für 1000 ml Lösung weiße Kappe | 2x 100 ml Konzentrat für 2x 1000 ml Lösung weiße Kappe |
| 3 | DIL | Verdünnungsmedium | 100 ml gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe | 2x 100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe |
| 4 | CONTROL + | Positive Kontrolle <i>Adenovirus</i> Antigen Ad 41, inaktiviert | 1,5 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe | 3 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe |
| 5 | CONTROL - | Negative Kontrolle <i>Adenovirus</i> negative Probe | 1,5 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe | 3 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe |
| 6 | CONJ HRP | POD-Konjugat POD-markierte, monoklonale anti-Adenovirus-Antikörper (Maus) | 12 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt braune Kappe | 24 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt braune Kappe |
| 7 | SUBSTR TMB | Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid | 15 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe | 28 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe |
| 8 | STOP | Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure | 15 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe | 28 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe |

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Gewinnung und Lagerung

Stuhlproben sollten sofort nach der Entnahme bei 2...8°C gelagert und innerhalb von 72 h untersucht oder eingefroren bei -20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate zu vermeiden. Stuhlproben, die bereits im *Serazym*[®] Verdünnungsmedium entsprechend Testanleitung verdünnt wurden, können bis zu 72 h bei 2...8°C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

Vorbereitung und Verwendung

Eingefrorene Stuhlproben zügig auftauen und ebenso wie mit Transportmedien behandelte Proben gut durchmischen. Der *Serazym*[®] Adenovirus kann mit 1 : 6 oder 1 : 11 verdünnten Stuhlsuspensionen durchgeführt werden. Die Verwendung der 1 : 6-Verdünnung empfiehlt sich, wenn aus derselben Probe auch der *Serazym*[®] Norovirus der *Serazym*[®] Campylobacter und/oder der *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B durchgeführt werden soll.

Herstellung einer 1 : 11-Probenverdünnung:

In ein Reaktionsgefäß 1000 µl Verdünnungsmedium pipettieren. Bei festen oder halbfesten Stuhlproben 100 mg (Durchmesser etwa 2 - 3 mm) mit einem Einmalstäbchen, bei flüssigen Stuhlproben 100 µl in das Probenverdünnungsmedium überführen und sorgfältig mischen. Gegebenenfalls Schwebeteilchen durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge 1 min bei maximaler Drehzahl sedimentieren.

Alternativ: Herstellung einer 1 : 6-Probenverdünnung:

In ein Reaktionsgefäß 1000 µl Verdünnungsmedium pipettieren. Bei festen oder halbfesten Stuhlproben 200 mg (Durchmesser etwa 4 - 6 mm) mit einem Einmalstäbchen, bei flüssigen Stuhlproben 200 µl in das Probenverdünnungsmedium überführen und sorgfältig mischen. Gegebenenfalls Schwebeteilchen durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge 1 min bei maximaler Drehzahl sedimentieren.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette · 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen · 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät · Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und \geq 620 nm Referenzfilter · destilliertes oder deionisiertes Wasser · Messzylinder · Teströhrchen (2 ml) für die Probenverdünnung

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 1x 96 oder 2x 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8°C mindestens 2 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei 2...8°C Lagerung mindestens 1 Monat verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminium-beschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen. Waschpufferkonzentrat (10-fach) 1 + 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 ml Waschpufferkonzentrat (2) + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser.

Testdurchführung

Proben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 11 oder 1 : 6 verdünnen, z.B. 100 mg oder 100 µl Stuhlprobe + 1,0 ml (1 : 11) bzw. 200 mg oder 200 µl Stuhlprobe + 1,0 ml (1 : 6) Verdünnungsmedium (3). Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten. Beim Waschvorgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen! Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Arbeitsschritte

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. 2 Tropfen (oder 75 µl) **CONJ HRP** POD- Konjugat (6) pro Kavität.
3. Je 75 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
75 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
50 µl **verdünnte Probe** pipettieren und kurz schütteln.
4. Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
5. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
6. 2 Tropfen (oder 75 µl) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
7. 10 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
8. 2 Tropfen (oder 75 µl) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
9. Messen der OD bei 450 nm / ≥ 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

Berechnung der Ergebnisse

Qualitative Evaluierung

Cut-off Bestimmung: OD Negative Kontrolle + 0,20

Proben mit OD-Werten gleich dem oder oberhalb des errechneten Grenzwertes sind als positiv, Proben mit OD-Werten unterhalb des errechneten Grenzwertes sind als negativ im *Serazym*[®] Adenovirus zu bewerten.

Referenzwerte

| <i>Serazym</i>[®] Adenovirus | |
|--|-----------|
| Positiv | ≥ Cut-off |
| Negativ | < Cut-off |

Aufgrund von Unterschieden im Einsender-Klientel wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche bestimmen sollte. Die genannten Werte sind deshalb nur als Empfehlung zu werten.

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- OD-Mittelwert der negativen Kontrolle $\leq 0,20$ (manuelle Abarbeitung)
 $\leq 0,30$ (automatisierte Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der positiven Kontrolle $\geq 1,20$

Sind die o. g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Grenzen der Methode

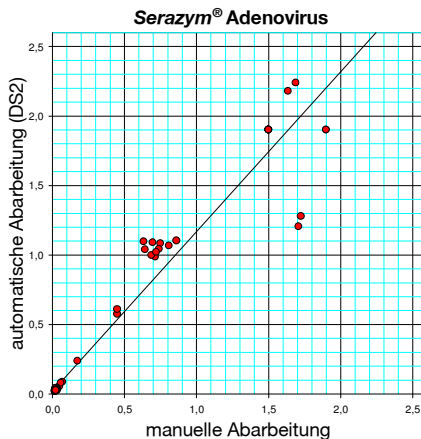
Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von *Adenovirus* in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle in Korrelation gesetzt werden. Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu falschen Ergebnissen führen. Unkorrekte Verdünnung, ungenügende Homogenisierung der Proben sowie nicht sedimentierte Festbestandteile in zentrifugierten Proben können sowohl zu falsch positiven als auch zu falsch negativen Ergebnissen führen. Der Erregernachweis sollte zum Zeitpunkt der akuten Krankheitsphase erfolgen, da dann die Anzahl der ausgeschiedenen Viruspartikel am höchsten ist. Ein negatives Ergebnis im ELISA schließt eine Adenovirus-Infektion nicht zwangsläufig aus. Ursachen falsch negativer Ergebnisse können einerseits durch einen ungünstigen Zeitpunkt der Probennahme und andererseits durch eine inhomogene Antigenverteilung in der Probe bedingt sein. Die Gesamtinterpretation des ELISA-Testergebnisses sollte im Zusammenhang mit der Klinik erfolgen.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Serazym*[®] Adenovirus auf einem Mikrotitrationsplatten-Vollautomaten (wie z.B. DS2, DSX) können in Abhängigkeit vom verwendeten Gerät und von den individuellen Geräteeinstellungen im Vergleich zur manuellen Bearbeitung höhere OD-Werte gemessen werden. In diesen Fällen ist die Erhöhung des max. zulässigen Grenzwertes für die OD der Negativ-Kontrolle auf 0,3 zulässig. Für den Waschprozess ist die Einprogrammierung von Waschpuffer-Einwirkzeiten (mind. 10 sec pro Streifen und Waschschrift) gefolgt von einem Waschschrift mit destilliertem oder demineralisiertem Wasser und 10 sec Einwirkzeit zu empfehlen. Gegebenenfalls kann die Anzahl der Waschschriffe von 5x auf 7x bis 8x erhöht werden.

Korrelation: manuelle – automatische Abarbeitung

Bei der parallelen Untersuchung von 110 Stuhlproben in manueller und automatischer Abarbeitung (DS2, Dynex Technologies) konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,974 ermittelt werden.



Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizient (VK) im Serazym® Adenovirus aus 8-fach Bestimmungen von Proben:

| Probe | OD-Mittelwert | Standardabweichung | VK (%) |
|-------|---------------|--------------------|--------|
| 1 | 2,792 | 0,160 | 5,7 |
| 2 | 2,059 | 0,167 | 8,1 |
| 3 | 1,368 | 0,094 | 6,9 |
| 4 | 0,718 | 0,068 | 9,4 |

Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) im Serazym® Adenovirus in 6 unterschiedlichen Ansätzen aus 8-fach Bestimmungen von Proben:

| Probe | OD-Mittelwert | Standardabweichung | VK (%) |
|-------|---------------|--------------------|--------|
| 1 | 1,850 | 0,107 | 5,8 |
| 2 | 1,057 | 0,069 | 6,5 |
| 3 | 0,574 | 0,042 | 7,3 |
| 4 | 0,312 | 0,030 | 9,6 |

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze von Adenovirus-Antigen im Serazym® Adenovirus wurde durch Titration von gereinigtem Adenovirus-Antigen (Hexon) mit 6 ng / ml bestimmt.

Spezifität und Sensitivität

Im Rahmen einer Studie wurden insgesamt 330 Stuhlproben parallel im Serazym® Adenovirus und einem anderen kommerziellen ELISA untersucht.

| | Vergleichs ELISA positiv | Vergleichs ELISA negativ |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Serazym® ELISA positiv | 55 | 1 |
| Serazym® ELISA negativ | 2 | 272 |

Spezifität: 99,6% · Sensitivität: 96,5%

Kreuzreaktivität

Stuhlproben, die für nachfolgend aufgeführte Erreger positiv getestet waren, zeigten bei Untersuchung im Serazym® Adenovirus keine Kreuzreaktivität:

Rotavirus (n = 10), *Astrovirus* (n = 8), *Norovirus* (n = 31), *Clostridium difficile* (n = 11), *Campylobacter jejuni* (n = 7), *Campylobacter coli* (n = 1), *Salmonella enteritidis* (n = 18), *Giardia lamblia* (n = 1).

Negative Stuhlsuspensionen wurden mit folgenden Mikroorganismen mit einer Keimzahl von $\geq 10^8$ Kolonie bildenden Einheiten pro ml aufgestockt und im Serazym® ELISA negativ getestet (OD 450 / 620 nm < Cut-Off)

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | (ATCC 7966) |
| <i>Bacillus cereus</i> | (ATCC 11778) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | (ATCC 6633) |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | (ATCC 25285) |
| <i>Candida albicans</i> | (ATCC 10231) |
| <i>Campylobacter coli</i> | (ATCC 33559) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | (ATCC 33291) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | (ATCC 8090) |
| <i>Clostridium sordellii</i> | (ATCC 9714) |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | (ATCC 13048) |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | (ATCC 13047) |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | (ATCC 29212) |
| <i>Escherichia coli</i> | (ATCC 25922) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | (ATCC 13883) |
| <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> | (ATCC 27337) |
| <i>Proteus vulgaris</i> | (ATCC 8427) |

| | |
|---|-------------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | (ATCC 10145) |
| <i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>enteritidis</i> | (ATCC 13076) |
| <i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i> | (ATCC 14028) |
| <i>Shigella flexneri</i> | (ATCC 12022) |
| <i>Shigella sonnei</i> | (ATCC 25931) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | (ATCC 25923) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | (ATCC 12228) |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | (ATCC 17802) |
| <i>Vibrio cholerae</i> | Klinisches Isolat |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> Serotyp <i>O3, O9</i> | Klinische Isolate |

Interferenz

Die nachfolgend aufgelisteten Substanzen zeigten bei Zumischung zu positiven und negativen Stuhlproben in den angegebenen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis: Bariumsulfat (5%), Buscopan® (2 mg/ml), Cyclamat (5%), Diclofenac (2 mg/ml), Hämoglobin human (5 mg/ml), Blut human (1,25%), Hylak® N (5%), Iberogast® (5%), Immodium® akut duo (0,2/12,5 mg/ml), Loperamid (0,2 mg/ml), Metronidazol (2 mg/ml), Mucin (5 mg/ml), Nexium® (2 mg/ml), Palmitinsäure (20%), Pentofuryl® (2 mg/ml), Pepto-Bismol (1 mg/ml), Perenterol (2,5 mg/ml), Rennie® (8 mg/ml), Simagel® (2 mg/ml), Stearinsäure (20%), Vancomycin (2 mg/ml).

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Mikrotiterplatten und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer, TMB/Substratlösung und Stopplösung.**

Das Verdünnungsmedium, der Waschpuffer, die TMB/Substratlösung und Stopplösung kann darüber hinaus Parameter-übergreifend für die Serazytt® Stuhlteste Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) und Giardia (E-106) eingesetzt werden.

Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8°C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

Nicht essen, trinken oder rauchen!

Nie mit dem Mund pipettieren!

Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!





Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!













Änderungshistorie

| Version | Abschnitt | Änderungen |
|------------|--|--|
| 2020-11-04 | Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen | Aktualisierung |
| | Änderungshistorie | Einführung des Abschnittes "Änderungshistorie" |
| | Testkomponenten | Aktualisierung |

Inkubationsschema *Serazym*[®] Adenovirus (E-017)

1.  2 Tropfen (oder 75 µl) **CONJ HRP** (6)
 +
 75 µl **CONTROL +** (4)
 75 µl **CONTROL -** (5)
 50 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren, kurz schütteln
 60 min Inkubation (Raumtemperatur)
-  5 x Waschen mit Waschlösung
2.  2 Tropfen (oder 75 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min Inkubation (Raumtemperatur, lichtgeschützt)
3.  2 Tropfen (oder 75 µl) **STOP** (8)

Messung der OD bei 450 / ≥ 620 nm

| | | | | |
|---|--|---|---|--------------------------|
|  Hersteller |  Herstellungsdatum |  Verwendbar bis | LOT Charge | REF Artikelnummer |
|  Vor Sonnenlicht schützen |  Temperaturbegrenzung |  Biologische Risiken |  Nicht wiederverwendbar | |
|  Gebrauchsanweisung beachten |  Achtung | IVD <i>In-vitro</i> - Diagnostikum |  Ausreichend für <n> Prüfungen | |

Serazym[®] Adenovirus

Enzyme immunoassay for detection of *Adenovirus* in faecal samples

REF E-017 ▽ 96 REF E-017-A2 ▽ 2x 96 IVD *In-vitro*-diagnostic medical device CE



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Introduction

Adenovirus is the causative agent of respiratory tract infections, conjunctivitis or enteritis. *Adenovirus* infections are spread via faecal-oral transmission or aerosols (1). Most infections are mild to moderate and do not last longer than one week. *Adenovirus* is responsible for 2 - 8% of respiratory tract infections and 7 - 17% of diarrheal diseases in children (2). Thirty percent of viral diarrheas in immunocompromised patients are caused by *Adenovirus* infections (1). The diagnosis of *Adenovirus* infections is preferably done by direct detection in faecal specimens or swabs. Due to the difficulty of *Adenovirus* culture on tissue or cell culture virus detection so far has been performed by electron microscopy. Meanwhile immunological methods like enzyme immunoassay (ELISA) have been developed for antigen detection (3). ELISA techniques are based on poly- and/or monoclonal antibodies to the protein hexon representing the major part of the virus capsid.

References:

1. Mentel, R. und Döhner, L. (1996): „Humane Adenoviren.“ Diagnostische Bibliothek Band 1 Virusdiagnostik, Hrsg. Tomas Porstmann, Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien 1996, S. 103-114
2. Schoenemann W. (1988): “Bedeutung von Adenovirusinfektionen im Säuglings- und Kleinkindesalter” Monatsschrift Kinderheilkunde 136: 680-685
3. August, M. J. and Warford, A. L. (1987): „Evaluation of a Commercial Monoclonal Antibody for Detection of Adenovirus Antigen.” Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 25, No. 11: 2233-2235

Intended Use

Serazym® Adenovirus is an *in-vitro*-diagnostic medical device for direct detection of *Adenovirus* in faecal samples.

Principle Of The Test

Serazym® Adenovirus is a one-step enzyme immunoassay on the basis of monoclonal antibodies against an epitope of the capsid protein hexon, common to all human pathogenic *Adenovirus* serotypes. Diluted stool specimens and horseradish peroxidase (HRP) labelled monoclonal anti-Adenovirus-antibodies are dispensed simultaneously into the wells of a microtitration plate coated with monoclonal anti-Adenovirus-antibodies. After an incubation time of 60 min at room temperature (RT) unbound components are removed by a washing step. HRP converts the subsequently added colourless substrate solution of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) within a 10 min reaction time at room temperature protected from light into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells turning the solution from blue to yellow. The optical density (OD) of the solution read at 450 / ≥ 620 nm is directly proportional to the specifically bound amount of *Adenovirus*. Considering the cut-off value results are interpreted as positive or negative.

Test Components

| | | | For 96 Wells | For 2x 96 Wells |
|---|-------------------------|--|---|--|
| 1 | WELLS | Microtitration plate coated with monoclonal anti-Adenovirus-antibodies (mouse) | 12 single breakable 8-well strips colour coding violet vacuum-sealed with desiccant | 2x 12 single breakable 8-well strips colour coding violet vacuum-sealed with desiccant |
| 2 | WASHBUF CONC 10x | Wash buffer 10-fold | 100 ml concentrate for 1000 ml solution white cap | 2x 100 ml concentrate for 2x 1000 ml solution white cap |
| 3 | DIL | Sample diluent | 100 ml · ready to use coloured yellow black cap | 2x 100 ml · ready to use coloured yellow black cap |
| 4 | CONTROL + | Positive control <i>Adenovirus</i> antigen Ad 41 (inactivated) | 1.5 ml · ready to use coloured blue red cap | 3.0 ml · ready to use coloured blue red cap |
| 5 | CONTROL - | Negative control <i>Adenovirus</i> negative sample | 1.5 ml · ready to use coloured blue green cap | 3.0 ml · ready to use coloured blue green cap |
| 6 | CONJ HRP | HRP-conjugate HRP-labelled, monoclonal anti-Adenovirus-antibodies (mouse) | 12 ml · ready to use coloured green brown cap | 24 ml · ready to use coloured green brown cap |
| 7 | SUBSTR TMB | Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide | 15 ml · ready to use blue cap | 28 ml · ready to use blue cap |
| 8 | STOP | Stop solution 0.25 M sulphuric acid | 15 ml · ready to use yellow cap | 28 ml · ready to use yellow cap |

Preparation And Storage Of Samples

Collection and storage

Stool samples should be stored at 2...8°C immediately after collection and processed within 72 hours. Longer storage is possible at -20°C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided. Stool samples already diluted with the *Serazym*[®] sample diluent can be stored for up to 72 h at 2...8°C before testing in the ELISA.

Preparation

Quickly thaw frozen samples. Warm samples to room temperature and mix well.

The *Serazym*[®] Adenovirus can be performed with 1 : 6 or 1 : 11 diluted specimens. In case of additional testing of the same sample in the *Serazym*[®] Norovirus, the *Serazym*[®] Campylobacter or the *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B the 1 : 6 dilution is recommended.

Preparation of a 1 : 11 sample dilution:

Pipette 1000 µl of sample diluent into a clean tube. Using a disposable stirring rod transfer about 100 mg (diameter about 2 - 3 mm) of faeces if solid or pipette 100 µl if liquid into the tube and suspend thoroughly. If necessary, sediment floating particles by a centrifugation step with a micro centrifuge for one min at maximum speed.

Preparation of a 1 : 6 sample dilution:

Pipette 1000 µl of sample diluent into a clean tube. Using a disposable stirring rod transfer about 200 mg (diameter about 4 - 6 mm) of faeces if solid or pipette 200 µl if liquid into the tube and suspend thoroughly. If necessary, sediment floating particles by a centrifugation step with a micro centrifuge for one min at maximum speed.

Materials Required But Not Provided

Micropipettes · multi-channel pipette or multi-pipette · reagent container for multi-channel pipette · 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer · microplate reader with optical filters of 450 nm for measurement and ≥ 620 nm for reference · distilled or deionized water · glassware · tubes (2 ml) for sample preparation

Preparation And Storage Of Reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1x 96 or 2x 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label; that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8°C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 2 months, provided proper storage. The ready to use wash solution can be used for at least 30 days when stored at 2...8°C.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the 10-fold concentrated wash buffer 1 + 9 with distilled or deionized water.

For Example: 10 ml wash buffer concentrate (2) + 90 ml distilled or deionized water.

Assay Procedure

Dilute samples with sample diluent (3) 1 : 11 or 1 : 6, e.g. 100 mg or 100 µl stool + 1.0 ml (1 : 11) sample diluent (3) or 200 mg or 200 µl stool + 1.0 ml (1 : 6) sample diluent (3).

Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.

Make sure the soak time of the wash buffer in the wells is at least 5 seconds per wash cycle and that the remaining fluid is completely drained in every single wash cycle!

Avoid light exposure of the TMB substrate solution!

Working steps

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Dispense 2 drops (or 75 µl) **CONJ HRP** HRP-conjugate (6) per well and
3. Pipette: 75 µl **CONTROL +** positive control (4)
75 µl **CONTROL -** negative control (5)
50 µl **diluted sample**, mix gently.
4. Cover plate and incubate for 60 min at RT.
5. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper.
6. Dispense 2 drops (or 75 µl) **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
7. Incubate for 10 min at RT protected from light.
8. Dispense 2 drops (or 75 µl) **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
9. Read OD at 450 nm / \geq 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction Stop.

Result Interpretation

Qualitative evaluation

Cut-off determination: OD negative control + 0.20

Samples with OD values equal with or higher than the cut-off are considered positive, samples with OD values below the cut-off are considered negative for *Adenovirus* antigen.

Reference Values

| Serazym® Adenovirus | |
|----------------------------|----------------|
| Positive | \geq Cut-off |
| Negative | $<$ Cut-off |

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges as usually done for other diagnostic parameters, too. Therefore, the mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

Test validity

The test run is valid if:

Performance Characteristics

Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*[®] Adenovirus from 8-fold determinations of samples:

| sample | mean OD | standard deviation | CV (%) |
|--------|---------|--------------------|--------|
| 1 | 2.792 | 0.160 | 5.7 |
| 2 | 2.059 | 0.167 | 8.1 |
| 3 | 1.368 | 0.094 | 6.9 |
| 4 | 0.718 | 0.068 | 9.4 |

Inter-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*[®] Adenovirus in 6 different test runs from 8-fold determinations of samples:

| sample | mean OD | standard deviation | CV (%) |
|--------|---------|--------------------|--------|
| 1 | 1.850 | 0.107 | 5.8 |
| 2 | 1.057 | 0.069 | 6.5 |
| 3 | 0.574 | 0.042 | 7.3 |
| 4 | 0.312 | 0.030 | 9.6 |

Lower detection limit

The lower detection limit of *Adenovirus* antigen in the *Serazym*[®] Adenovirus was determined by titration of purified *Adenovirus* antigen (hexon). Lower detection limit: 6 ng / ml

Specificity and sensitivity

A total of 330 stool samples were investigated in parallel in the *Serazym*[®] Adenovirus and in another commercially available ELISA.

| | comparative ELISA positive | comparative ELISA negative |
|--|----------------------------|----------------------------|
| <i>Serazym</i>[®] ELISA positive | 55 | 1 |
| <i>Serazym</i>[®] ELISA negative | 2 | 272 |

Specificity: 99.6% · Sensitivity: 96.5%

Cross reactivity

Stool samples positive for one of the subsequent pathogens have been tested with the *Serazym*[®] Adenovirus and showed no cross reactivity:

Rotavirus (n = 10), *Astrovirus* (n = 8), *Norovirus* (n = 31), *Clostridium difficile* (n = 11), *Campylobacter jejuni* (n = 7), *Campylobacter coli* (n = 1), *Salmonella enteritidis* (n = 18), *Giardia lamblia* (n = 1).

Negative stool specimens have been spiked with $\geq 10^8$ colony forming units of the following microorganisms and tested negative with the *Serazym*[®] ELISA (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

| | |
|-------------------------------|--------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | (ATCC 7966) |
| <i>Bacillus cereus</i> | (ATCC 11778) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | (ATCC 6633) |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | (ATCC 25285) |
| <i>Candida albicans</i> | (ATCC 10231) |
| <i>Campylobacter coli</i> | (ATCC 33559) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | (ATCC 33291) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | (ATCC 8090) |
| <i>Clostridium sordellii</i> | (ATCC 9714) |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | (ATCC 13048) |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | (ATCC 13047) |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | (ATCC 29212) |
| <i>Escherichia coli</i> | (ATCC 25922) |

| | |
|---|-------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | (ATCC 13883) |
| <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> | (ATCC 27337) |
| <i>Proteus vulgaris</i> | (ATCC 8427) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | (ATCC 10145) |
| <i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>enteritidis</i> | (ATCC 13076) |
| <i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i> | (ATCC 14028) |
| <i>Shigella flexneri</i> | (ATCC 12022) |
| <i>Shigella sonnei</i> | (ATCC 25931) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | (ATCC 25923) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | (ATCC 12228) |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | (ATCC 17802) |
| <i>Vibrio cholerae</i> | clinical isolate |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> Serotyp <i>O3, O9</i> | clinical isolates |

Interference

None of the following substances added to positive and negative stool samples showed a significant impact on the test result:

Barium sulfate (5%), Buscopan® (2 mg/ml), Cyclamate (5%), Diclofenac (2 mg/ml), Hemoglobine human (5 mg/ml), Blood human (1,25%), Hylak® N (5%), Iberogast® (5%), Immodium® akut duo (0.2/12.5 mg/ml), Loperamide (0.2 mg/ml), Metronidazole (2 mg/ml), Mucin (5 mg/ml), Nexium® (2 mg/ml), Palmitic acid (20%), Pentofuryl® (2 mg/ml), Pepto-Bismol (1 mg/ml), Perenterol (2.5 mg/ml), Rennie® (8 mg/ml), Simagel® (2 mg/ml), Stearic acid (20%), Vancomycin (2 mg/ml).

Common Advices and Precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instructions carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. Do not use reagents from damaged packages or bottles. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. **Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution.**

The sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution is universally applicable for the *Serazym*® stool ELISA Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) and Giardia (E-106).

Do not use reagents from other manufacturers. Avoid time shift during dispensing of reagents. All reagents should be kept at 2...8°C before use. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous. Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should generally be observed:

Do not smoke, eat or drink while handling kit material!

Always use protective gloves!

Never pipette material by mouth!


Note safety precautions of the single test components!





History of Changes


| Version | Section | Modifications |
|------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 2020-11-04 | Common Advices and Precautions | Update |
| | History of Changes | Adding section "History of Changes " |
| | Test Components | Update |

Incubation Scheme *Serazym*[®] Adenovirus (E-017)











1.  2 drops (or 75 µl) **CONJ HRP** (6)
 +
 pipette
 75 µl **CONTROL +** (4)
 75 µl **CONTROL -** (5)
 50 µl **diluted stool sample**, mix gently
 60 min incubation (room temperature)

 5 x wash with wash solution

2.  2 drops (or 75 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min incubation (room temperature) protected from light

3.  2 drops (or 75 µl) **STOP** (8)

Read OD at 450 / ≥ 620 nm

| | | | | |
|--|---|--|---|---------------------------|
|  Manufacturer |  Date of manufacture |  Use by | LOT Batch code | REF Catalog number |
|  Keep away from sunlight |  Temperature limits |  Biological risks |  Do not reuse | |
|  Consult instructions for use |  Caution | IVD <i>In-vitro</i> -diagnostic medical device |  Contains sufficient for <n> tests | |