

# Serazym<sup>®</sup> Rotavirus

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Rotavirus in Stuhlproben

REF E-020 ▽ 96 REF E-020-A2 ▽ 2x 96 IVD *In-vitro*-Diagnostikum CE



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · [www.seramun.com](http://www.seramun.com)  
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · [info@seramun.com](mailto:info@seramun.com)

## Einführung

Rotaviren der Gruppe A sind die häufigste Ursache von nicht bakteriellen Gastroenteritiden bei Säuglingen und Kleinkindern im Alter zwischen 4 Monaten und 3 Jahren (1 - 5). Rotaviren werden in großen Mengen ( $10^9$  -  $10^{11}$  Viruspartikel pro Gramm Stuhl) in den Darm ausgeschieden, so dass nosokomiale Infektionen besonders auf Säuglingsstationen und in Kinderkliniken gefürchtet sind (3). Rotavirusinfektionen wurden auch im Rahmen von Reisediarrhoen bei Erwachsenen beobachtet und im Stuhl asymptomatischer Ausscheider nachgewiesen (1). Rotaviren werden fäkal-oral von Mensch zu Mensch oder über kontaminierte Gegenstände übertragen. Infektionen treten in den gemäßigten Klimazonen vorzugsweise in den Wintermonaten auf (1). Aufgrund der langwierigen Kultur der Viren auf primären Affenierenzellen oder permanenten Zelllinien besitzt die Virusanzucht keine diagnostische Relevanz. Der Goldstandard für die Diagnostik ist der elektronenmikroskopische Virusnachweis (1, 2). Inzwischen sind Antigennachweise auf der Basis immunologischer Techniken als Agglutinationsteste oder als Enzymimmunoassays mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen das gruppenspezifische Antigen (VP-6) etabliert (1 - 5).

## Literatur:

1. Böthig, B. und Diedrich, S. (1996): "Rotaviren" Diagnostische Bibliothek Band 1 Virusdiagnostik, Hrsg. Tomas Porstmann, Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien 1996, S. 441-451
2. Grauballe, B.F. et al. (1981): "Optimized Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Human and Bovine Rotavirus in Stools: Comparison with Electron-Microscopy, Immuno-electro-Osmophoresis and Fluorescent Antibody Techniques." Journal of Medical Virology 7: 29-40
3. Coulson, B.S. and I.H. Holmes (1984): "An Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay For The Detection Of Rotavirus In Faeces Of Neonates." Journal of Virological Methods, 8: 165-179
4. Cukor G. et al. (1984): "Detection of Rotavirus in Human Stools by Using Monoclonal Antibody." Journal of Clinical Microbiology 19: 888-892
5. Cukor G. and N.R. Blacklow (1984): "Human Viral Gastroenteritis", Microbiological Reviews 48 No.2, p. 157-179.

## Anwendungsbereich

Der *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum direkten Nachweis von Rotavirus in Stuhlproben.

## Testprinzip

Der *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus ist ein Ein-Schritt Enzymimmunoassay auf der Basis polyklonaler Antikörper gegen das gruppenspezifische VP-6 Antigen, welches das Hauptprotein des inneren Kapsids von Rotaviren der Gruppe A repräsentiert. Verdünnte unbehandelte Stuhlproben und Peroxidase-(POD)-markierte polyklonale anti-Rotavirus-Antikörper werden simultan in die mit polyklonalen anti-Rotavirus-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur werden die ungebundenen Komponenten durch einen Waschschriff entfernt. Im anschließenden Substratreaktionsschritt (10 min, Raumtemperatur) 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 sich die blauen Produktlösung gelb färbt. Die optische Dichte (OD) des Endprodukts bei 450/620 nm ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Rotavirus-Antigene direkt proportional.

## Testkomponenten

			Für 96 Kavitäten	Für 2x 96 Kavitäten
1	<b>WELLS</b>	<b>Mikrotiterplatte</b> beschichtet mit polyklonalen anti-Rotavirus-Antikörpern (Schaf)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung dunkelblau vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung dunkelblau vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	<b>WASHBUF CONC 10x</b>	<b>Waschpuffer</b> 10-fach	100 ml Konzentrat für 1000 ml Lösung weiße Kappe	2x 100 ml Konzentrat für 2x 1000 ml Lösung weiße Kappe
3	<b>DIL</b>	<b>Verdünnungsmedium</b>	100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe	2x 100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe
4	<b>CONTROL +</b>	<b>Positive Kontrolle</b> Rotavirus reaktive Probe	1,5 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe	3 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	<b>CONTROL -</b>	<b>Negative Kontrolle</b> Rotavirus negative Probe	1,5 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe	3 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6	<b>CONJ HRP</b>	<b>POD-Konjugat</b> POD-markierte polyklonale anti-Rotavirus-Antikörper (Kaninchen)	12 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt braune Kappe	24 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt braune Kappe
7	<b>SUBSTR TMB</b>	<b>Substrat</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe	28 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe
8	<b>STOP</b>	<b>Stopplösung</b> 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*<sup>®</sup> 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*<sup>®</sup> Rotavirus 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*<sup>®</sup> Norovirus, der *Serazym*<sup>®</sup> Campylobacter und/oder der *Serazym*<sup>®</sup> 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 stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8°C mindestens 2 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei Lagerung bei 2...8°C 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 abdecken 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 /  $\geq 620$  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 oder oberhalb des errechneten Grenzwertes sind als positiv, Proben mit OD-Werten unterhalb des errechneten Grenzwertes sind als negativ im *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus zu bewerten.

## Referenzwert

<b>Serazym<sup>®</sup> Rotavirus</b>	
Positiv	$\geq$ 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)  
 $\leq 0,30$  (automatische 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

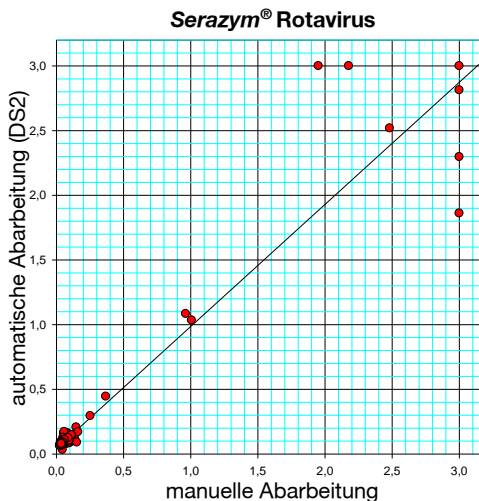
Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von Rotavirus in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle in Korrelation gesetzt werden. Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien 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. Impfviren, die im Rahmen einer Rotavirus-Vakzinierung oral verabreicht werden, können mit dem Stuhl ausgeschieden werden und ein positives ELISA Ergebnis verursachen. Ein negatives Ergebnis im Rotavirus ELISA schließt eine Rotavirus-Infektion nicht zwangsläufig aus. Ursachen falsch negativer Ergebnisse können einerseits durch einen ungünstigen Zeitpunkt der Probenahme 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*<sup>®</sup> Rotavirus 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 Waschschrift von 5x auf 7x bis 8x erhöht werden.

## Korrelation: manuelle – automatische Abarbeitung

Bei der parallelen Untersuchung von 133 Stuhlproben in manueller und automatischer Abarbeitung (DS2, Dynex Technologies) konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,96 ermittelt werden.



## Leistungsmerkmale

### Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus aus 12-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
1	1,841	0,137	7,45
2	1,208	0,078	6,50
3	0,620	0,040	6,38
4	0,463	0,024	5,26

Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus in 10 unterschiedlichen Ansätzen aus 3-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
1	2,720	0,128	4,71
2	1,647	0,122	7,38
3	0,968	0,074	7,69
4	0,409	0,019	4,58

### Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze von Rotavirus-Antigen im *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus wurde durch Titration von gereinigtem Rotavirus-Antigen SA-11 mit < 10 ng/ml entsprechend ca. 10<sup>6</sup> Viruspartikeln/g Stuhl bestimmt.

### Spezifität und Sensitivität

Im Rahmen einer Studie wurden insgesamt 488 Stuhlproben parallel im *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus und einem anderen kommerziellen ELISA untersucht.

	Vergleichs ELISA positiv	Vergleichs ELISA negativ
<i>Serazym</i> <sup>®</sup> ELISA positiv	246	0
<i>Serazym</i> <sup>®</sup> ELISA negativ	4	238

Spezifität: 100% Sensitivität: 98,4%

### Kreuzreaktivität

Stuhlproben, die für nachfolgend aufgeführte Erreger positiv getestet wurden, zeigten bei Untersuchung im *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus keine Kreuzreaktivität:

Adenovirus (n = 20), 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), sowie Stuhlproben (n = 93) mit nachweisbaren (> 10 µg / g Stuhl) Hämoglobin-Konzentrationen.

Negative Stuhlsuspensionen wurden mit folgenden Mikroorganismen mit einer Keimzahl von ≥ 10<sup>8</sup> Kolonie bildenden Einheiten pro ml aufgestockt und im *Serazym*<sup>®</sup> 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 03, 09	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<sup>®</sup> (2 mg/ml), Cyclamat (5%), Diclofenac (2 mg/ml), Hämoglobin human (5 mg/ml), Blut human (5%), Hylak<sup>®</sup> N (5%), Iberogast<sup>®</sup> (5%), Immodium<sup>®</sup> akut duo (0,2/12,5 mg/ml), Loperamid (0,2 mg/ml), Metronidazol (2 mg/ml), Mucin (5 mg/ml), Nexium<sup>®</sup> (2 mg/ml), Palmitinsäure (20%), Pentofuryl<sup>®</sup> (2 mg/ml), Pepto-Bismol (1 mg/ml), Perenterol (2,5 mg/ml), Rennie<sup>®</sup> (8 mg/ml), Simigel<sup>®</sup> (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 *Serazym*<sup>®</sup> 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
2020-11-16	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung
	Änderungshistorie	Einführung des Abschnittes "Änderungshistorie"
	Testkomponenten	Aktualisierung



## Inkubationsschema Serazym® Rotavirus (E-020)

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 /  $\geq$  620 nm**



Hersteller



Herstellungsdatum



Verwendbar bis

**LOT** Charge

**REF** Artikelnummer



Vor Sonnenlicht schützen



Temperaturbegrenzung



Biologische Risiken



Nicht wiederverwendbar



Gebrauchsanweisung beachten



Achtung



**IVD** *In-vitro*- Diagnostikum



Ausreichend für <n> Prüfungen



## Serazym<sup>®</sup> Rotavirus

Enzyme immunoassay for detection of *Rotavirus* in faecal samples

REF E-020 ▽ 96 REF E-020-A2 ▽ 2x 96 IVD *In-vitro*-diagnostic medical device CE



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenthagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · [www.seramun.com](http://www.seramun.com)  
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · [info@seramun.com](mailto:info@seramun.com)

### Introduction

Group A Rotaviruses are the most common cause of non-bacterial gastroenteritis in children aged between 4 months and 3 years (1 - 5). Rotavirus is excreted into the intestine in large amounts ( $10^9$  –  $10^{11}$  virus particles per g faeces). Nosocomial infections therefore cause problems especially on baby wards and in childrens hospitals (3).

Rotavirus may also be responsible for travellers diarrhea in adults and have been detected in stool specimens of asymptomatic carriers as well (1). Rotavirus is spread by faecal-oral transmission from person to person or via contaminated staff. In temperate climates Rotavirus infections are mainly observed during the winter months (1).

Since virus culture on primary monkey kidney cells or permanent cell lines is time-consuming, these methods are of no diagnostic relevance. The golden standard is direct virus detection by electron microscopy (1, 2). Meanwhile antigen detection methods based on immunological techniques like agglutination tests or enzyme immunoassays using polyclonal or monoclonal antibodies against the group A specific antigen (VP-6) have been established (1 - 5).

## References:

1. Böthig, B. und Diedrich, S. (1996): "Rotaviren" Diagnostische Bibliothek Band 1 Virusdiagnostik, Hrsg. Tomas Porstmann, Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien 1996, S. 441-451
2. Grauballe, B.F. et al. (1981): "Optimized Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Human and Bovine Rotavirus in Stools: Comparison with Electron-Microscopy, Immuno-electro-Osmophoresis and Fluorescent Antibody Techniques." *Journal of Medical Virology* 7: 29-40
3. Coulson, B.S. and I.H. Holmes (1984): "An Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay For The Detection Of Rotavirus In Faeces Of Neonates." *Journal of Virological Methods*, 8: 165-179
4. Cukor G. et al. (1984): "Detection of Rotavirus in Human Stools by Using Monoclonal Antibody." *Journal of Clinical Microbiology* 19: 888-892
5. Cukor G. and N.R. Blacklow (1984): "Human Viral Gastroenteritis", *Microbiological Reviews* 48 No.2,p. 157-179.

## Intended Use

The *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus is an *in-vitro*-diagnostic medical device for direct detection of Rotavirus in faecal samples.

## Principle Of The Test

*Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus is a one-step enzyme immunoassay on the basis of polyclonal antibodies to the group specific VP-6 antigen, the major protein of group A Rotaviruses. Diluted stool specimens and horseradish peroxidase (HRP) labelled polyclonal anti-Rotavirus-antibodies are dispensed simultaneously into the wells of a microtitration plate coated with polyclonal anti-Rotavirus antibodies. After an incubation time of 60 min at room temperature 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 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 Rotavirus. Considering the cut-off value results are interpreted as positive or negative.

## Test Components

			For 96 Wells	For 2x 96 Wells
1	<b>WELLS</b>	<b>Microtitration plate</b> coated with polyclonal anti-Rotavirus-antibodies (sheep)	12 single breakable 8-well strips colour coding dark blue vacuum-sealed with desiccant	2x 12 single breakable 8-well strips colour coding dark blue vacuum-sealed with desiccant
2	<b>WASHBUF CONC 10x</b>	<b>Wash buffer</b> 10-fold	100 ml concentrate for 1000 ml solution white cap	2x 100 ml concentrate for 2x 1000 ml solution white cap
3	<b>DIL</b>	<b>Sample diluent</b>	100 ml · ready to use coloured yellow black cap	2x 100 ml · ready to use coloured yellow black cap
4	<b>CONTROL +</b>	<b>Positive control</b> Rotavirus reactive sample	1.5 ml · ready to use coloured blue red cap	3.0 ml · ready to use coloured blue red cap
5	<b>CONTROL -</b>	<b>Negative control</b> Rotavirus negative sample	1.5 ml · ready to use coloured blue green cap	3.0 ml · ready to use coloured blue green cap
6	<b>CONJ HRP</b>	<b>HRP-conjugate</b> HRP-labelled, polyclonal anti-Rotavirus-antibodies (rabbit)	12 ml · ready to use coloured green brown cap	24 ml · ready to use coloured green brown cap
7	<b>SUBSTR TMB</b>	<b>Substrate</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	15 ml · ready to use blue cap	28 ml · ready to use blue cap
8	<b>STOP</b>	<b>Stop solution</b> 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*<sup>®</sup> 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*<sup>®</sup> Rotavirus can be performed with 1 : 6 or 1 : 11 diluted specimens. In case of additional testing of the same sample in the *Serazym*<sup>®</sup> Norovirus, the *Serazym*<sup>®</sup> Campylobacter or the *Serazym*<sup>®</sup> 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  $\geq 620$  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 1 month 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 if necessary.
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 Rotavirus antigen.

## Reference Values

<b>Serazym® Rotavirus</b>	
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:

- the mean OD of the negative control is  $\leq$  0.20 (manual performance)  
 $\leq$  0.30 (automatic performance)
- the mean OD of the positive control is  $\geq$  1.20

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is followed correctly (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

### Limitations of the procedure

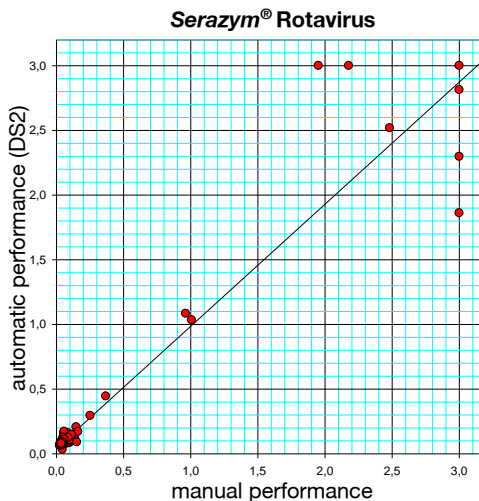
There is no correlation between measured absorbance and seriousness of the infection. It is also not allowed to correlate absorbances of the samples with that of the positive control. Cross contamination of reagents and samples can produce false positive results. Incorrect dilutions, not sufficiently homogenized samples or solid particles after centrifugation of the suspension can cause false negative as well as false positive results. A negative test result not necessarily excludes a *Rotavirus* infection. Inhomogeneous virus distribution in the sample can cause false negative results. The investigation of samples that were taken beyond the acute phase of the disease can cause false negative results, because the number of virus particles has decreased under the detection limit of the test. It is therefore recommended to take samples within the acute phase of the disease where a maximum number of excreted virus particles are to be expected. Faecal samples from vaccinated children may contain vaccine virus causing positive ELISA results. A final interpretation of the test results should consider clinical findings as well.

### Automatic Processing

Performing the *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus on fully automated microplate processors (e.g. DS2, DSX) may cause elevated absorbances in comparison to the manual procedure due to individual differences concerning wash procedures and general technical specifications of the equipment. In these cases a maximum value of 0.3 absorbance units is permissible for the negative control. It is recommended to use a wash procedure including 10 seconds soak time per strip and wash step followed by a wash step with distilled or deionized water with 10 seconds of soak time after the final wash step of each wash cycle. If necessary, the number of washing steps can be enhanced from 5x to 7x - 8x.

### Correlation: manual – automatic processing

A panel of 133 stool specimens was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with  $r = 0.96$ .





## Performance Characteristics

### Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus from 12-fold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	1.841	0.137	7.45
2	1.208	0.078	6.50
3	0.620	0.040	6.38
4	0.463	0.024	5.26

Inter-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus in 10 different test runs from 3-fold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	2.720	0.128	4.71
2	1.647	0.122	7.38
3	0.968	0.074	7.69
4	0.409	0.019	4.58

### Lower detection limit

The lower detection limit of *Rotavirus* antigen in the *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus was determined by titration of purified *Rotavirus* antigen SA-11: < 10 ng / ml corresponding to 10<sup>6</sup> virus particles / g faeces.

### Specificity and sensitivity

A total of 488 stool samples were investigated in parallel in the *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus and in another commercially available ELISA.

	comparative ELISA positive	comparative ELISA negative
<i>Serazym</i> <sup>®</sup> ELISA positive	246	0
<i>Serazym</i> <sup>®</sup> ELISA negative	4	238

Specificity: 100% · Sensitivity: 98.4%

### Cross reactivity

Stool samples positive for one of the subsequent pathogens have been tested with the *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus and showed no cross reactivity:

Adenovirus (n = 20), 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) and stool samples (n = 93) with detectable levels (> 10 µg / g) of haemoglobin.

Negative stool specimens have been spiked with ≥ 10<sup>8</sup> colony forming units of the following microorganisms and tested negative with the *Serazym*<sup>®</sup> ELISA (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 13883)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	(ATCC 27337)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)	<i>Proteus vulgaris</i>	(ATCC 8427)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 10145)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)	<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>enteritidis</i>	(ATCC 13076)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)	<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i>	(ATCC 14028)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)	<i>Shigella flexneri</i>	(ATCC 12022)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)	<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)
<i>Clostridium sordellii</i>	(ATCC 9714)	<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(ATCC 13048)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(ATCC 13047)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(ATCC 17802)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(ATCC 29212)	<i>Vibrio cholerae</i>	clinical isolate
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)	<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<sup>®</sup> (2 mg/ml), Cyclamate (5%), Diclofenac (2 mg/ml), Hemoglobin human (5 mg/ml), Blood human (5%), Hylak<sup>®</sup> N (5%), Iberogast<sup>®</sup> (5%), Immodium<sup>®</sup> akut duo (0.2/12.5 mg/ml), Loperamide (0.2 mg/ml), Metronidazole (2 mg/ml), Mucin (5 mg/ml), Nexium<sup>®</sup> (2 mg/ml), Palmitic acid (20%), Pentofuryl<sup>®</sup> (2 mg/ml), Pepto-Bismol (1 mg/ml), Perenterol (2.5 mg/ml), Rennie<sup>®</sup> (8 mg/ml), Simagel<sup>®</sup> (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*<sup>®</sup> 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
2020-11-16	Common Advices and Precautions	Update
	History of Changes	Adding section "History of Changes "
	Test Components	Update

## Incubation Scheme *Serazym*<sup>®</sup> Rotavirus (E-020)

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

