

Serazym[®] Astrovirus

Enzymimmunoassay zum Nachweis von *Astrovirus* in Stuhlproben

REF E-045 ▽ 96 REF E-045-A2 ▽ 2x 96 IVD *In-vitro*-Diagnostikum CE



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

Einführung

Astroviren wurden 1975 entdeckt und erhielten ihren Namen aufgrund ihrer elektronenmikroskopisch erkennbaren, sternförmigen Struktur. Astroviren gehören zur Familie der *Astroviridae*. Die humanen Astroviren lassen sich in 7 Serotypen unterteilen (1). Astroviren sind neben Rotaviren und Adenoviren weltweit eine der häufigsten Ursachen nicht bakterieller Gastroenteritiden bei Säuglingen und Kleinkindern unter 5 Jahren. Daher besitzen 80% der Kinder zwischen 5 und 10 Jahren Antikörper gegen Astroviren. Durch Astroviren verursachte Gastroenteritiden bei Erwachsenen sowie nosokomiale Infektionen wurden ebenfalls beobachtet (2). Der Krankheitsverlauf ist selbstlimitierend und von kurzer Dauer. Nach einer Inkubationszeit von 1 - 2 Tagen entwickelt sich eine 1 - 4 Tage dauernde Gastroenteritis mit Erbrechen, Diarrhoe, Fieber und abdominalen Schmerzen und nachfolgender Dehydrierung. Astrovirusinfektionen treten zwar das ganze Jahr über, im Winter jedoch vermehrt auf, was sie von den bakteriell bedingten Durchfallerkrankungen mit ihrem Sommer- und Herbstgipfel unterscheidet (3, 4). Astroviren werden fäkal-oral von Mensch zu Mensch oder über kontaminierte Gegenstände bzw. Lebensmittel übertragen. Erkrankte Personen scheiden Astroviren in großen Mengen mit dem Stuhl aus (1, 2). Der Nachweis von Astroviren kann elektronen-mikroskopisch erfolgen, zum anderen kann aber auch das Genom mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Für die Routinediagnostik hat sich zwischenzeitlich der Enzymimmunoassay (ELISA) durchgesetzt, der einen schnellen und sicheren Nachweis ermöglicht und darüber hinaus eine automatisierte Durchführung erlaubt (1).

Literatur:

1. Rohwedder, A. (2000): "Virale Gastroenteritiden, Erreger und Diagnostik", Mikrobiologie, 10. Jg. p.121-126.
2. Palombo, E. A. and Bishop, R. F. (1996): "Annual Incidence, Serotype Distribution and Genetic Diversity of Human Astrovirus Isolates from Hospitalized Children in Melbourne, Australia"; Journal of Clinical Microbiology, Vol. 34, No. 7, p. 1750-1753.

3. Cukor, G. and Blacklow, N. R. (1984): "Human Viral Gastroenteritis", Microbiological Reviews, June, Vol. 48 No. 2, p. 157-179.
4. Gaggero, A.; O'Ryan, M. et al. (1998): "Prevalence of Astrovirus Infection among Chilean Children with Acute Gastroenteritis", Journal of Clinical Microbiology, Vol. 36 No. 12, p. 3691-3693.

Anwendungsbereich

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

Testprinzip

Serazym® Astrovirus ist ein Ein-Schritt Enzymimmunoassay auf der Basis polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen *Astrovirus* Antigene. Verdünnte unbehandelte Stuhlproben und Peroxidase-(POD)-markierte monoklonale anti-Astrovirus-Antikörper werden simultan in die mit polyklonalen anti-Astrovirus Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) werden die ungebundenen Komponenten durch einen Waschschrift 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 / 620 nm ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Astrovirus-Antigene direkt proportional.

Testkomponenten

		Für 96 Kavitäten	Für 2x 96 Kavitäten	
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit polyklonalen anti-Astrovirus-Antikörpern (Schaf)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung hellblau vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung hellblau 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>Astrovirus</i> reaktive Probe	1,5 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe	3,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL -	Negative Kontrolle <i>Astrovirus</i> negative Probe	1,5 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe	3,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6	CONJ HRP	POD-Konjugat POD-markierte, monoklonale anti-Astrovirus-Antikörper	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 verdünnt wurden, können bis zu 48 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*[®] Astrovirus 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 ≥ 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 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 Stuhlprobe** 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 / \geq 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

Berechnung der Ergebnisse

Qualitative Evaluierung

Cut-off Bestimmung: OD Negative Kontrolle + 0,10

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*[®] Astrovirus zu bewerten.

Referenzwert

Serazym® Astrovirus	
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: ≤ 0,15 (manuelle Abarbeitung)
≤ 0,30 (automatische Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der Positiven Kontrolle ≥ 1,00

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

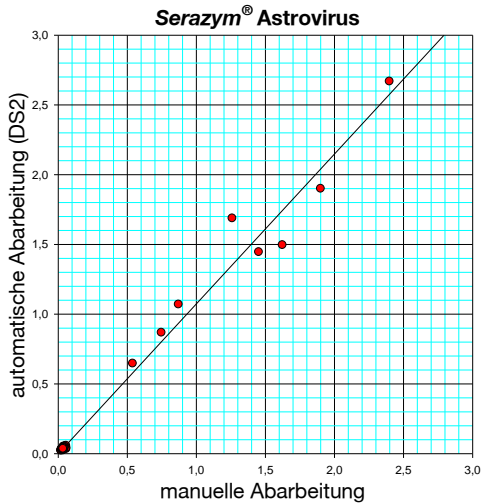
Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von *Astrovirus* in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle in Korrelation gesetzt werden. Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien 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 *Astrovirus* ELISA schließt eine *Astrovirus*-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*® *Astrovirus* 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 96 Stuhlproben in manueller und automatischer Abarbeitung (DS2, Dynex Technologies) konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,993 ermittelt werden.



Leistungsmerkmale

Präzision

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

Probe	Extinktions-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	1,667	0,148	8,9
2	0,994	0,063	6,4
3	0,443	0,027	6,1
4	0,185	0,018	9,8

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

Probe	Extinktions-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	1,853	0,071	3,8
2	1,019	0,059	5,8
3	0,583	0,069	11,9
4	0,350	0,034	9,7

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze von Astrovirus-Antigen im *Serazym®* Astrovirus wurde durch Titration von gereinigtem Astrovirus-Antigen mit 6 ng / ml bestimmt.

Spezifität und Sensitivität

Im Rahmen einer Studie wurden insgesamt 98 Stuhlproben parallel im *Serazym®* Astrovirus und einem anderen kommerziellen ELISA untersucht.

	Vergleichs-ELISA positiv	Vergleichs-ELISA negativ
<i>Serazym®</i> ELISA positiv	49	0
<i>Serazym®</i> ELISA negativ	2	47

Spezifität: 100% Sensitivität: 96%

Kreuzreaktivität

Stuhlproben, die für nachfolgend aufgeführte Erreger positiv getestet wurden, zeigten bei Untersuchung im *Serazym*[®] Astrovirus keine Kreuzreaktivität:

Rotavirus (n = 10), *Adenovirus* (n = 20), *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 (5 mg/ml), Hylak[®] N (5%), Immodium[®] akut duo (0,2/12,5 mg/ml), Iberogast[®] (5%), 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%).

* Hylak[®] N (Milchsäure-haltiges Präparat gegen Verdauungsbeschwerden) kann bei Zumischung von 5% (v/v) zu Astrovirus positiven Stuhlsuspensionen zu einer Verringerung der OD-Werte führen.

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 können darüber hinaus Parameter-übergreifend für die *Serazym*[®] 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
2020-07-21	Testkomponenten	Korrektur
	Testdurchführung	Aktualisierung
	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung
	Änderungshistorie	Einführung des Abschnittes "Änderungshistorie"

Inkubationsschema *Serazym*[®] Astrovirus (E-045)

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



Charge



Artikelnummer



Vor Sonnenlicht schützen



Temperaturbegrenzung



Biologische Risiken



Nicht wiederverwendbar



Gebrauchsanweisung beachten



Achtung



In-vitro- Diagnostikum



Ausreichend für <n> Prüfungen

Serazym[®] Astrovirus

Enzyme immunoassay for detection of *Astrovirus* in faecal samples

REF E-045 ▽ 96 REF E-045-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

Astrovirus was firstly described in 1975 and named according to its star-shaped structure visible under the electron microscope. *Astrovirus* belongs to the family *Astroviridae*. Human *Astroviruses* are subdivided into 7 serotypes (1). Together with Rotavirus and Adenovirus *Astrovirus* is one of the most common causes of non-bacterial gastroenteritis in children under 5 years of age all over the world. Thus 80% of children between 5 and 10 years of age are anti-Astrovirus-antibody positive. *Astrovirus* caused gastroenteritis in adults and nosocomial infections are observed as well (2). The course of the disease is usually self-limiting and of short duration. After the incubation time of 1 - 2 days a 1 - 4 days lasting gastroenteritis develops accompanied by vomiting, diarrhea, fever and abdominal pain finally causing dehydration. Although occurring all over the year *Astrovirus* infections are mainly observed during the winter months (3, 4). *Astrovirus* infections are spread via faecal-oral transmission from person to person or via contaminated things or food. Infected persons excrete high amounts of *Astrovirus* particles with their faeces (1, 2). The detection of *Astrovirus* may be performed by electron microscopy or by molecular biology techniques such as polymerase chain reaction (PCR). Meanwhile immunological methods like enzyme immunoassay have established as preferential methods for routine laboratory diagnosis since these methods are fast, safe and automation is possible (1).

References:

1. Rohwedder, A. (2000): "Virale Gastroenteritiden, Erreger und Diagnostik", *Mikrobiologie*, 10. Jg. p.121-126.
2. Palombo, E. A. and Bishop, R. F. (1996): "Annual Incidence, Serotype Distribution and Genetic Diversity of Human Astrovirus Isolates from Hospitalized Children in Melbourne, Australia"; *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 34, No. 7, p. 1750-1753.
3. Cukor, G. and Blacklow, N. R. (1984): "Human Viral Gastroenteritis", *Microbiological Reviews*, June, Vol. 48 No. 2, p. 157-179.

4. Gaggero, A.; O’Ryan, M. et al. (1998): “Prevalence of Astrovirus Infection among Chilean Children with Acute Gastroenteritis”, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 36 No. 12, p. 3691-3693.

Intended use

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

Principle of the test

Serazym® Astrovirus is a one-step enzyme immunoassay on the basis of polyclonal and monoclonal antibodies against *Astrovirus* antigens. Diluted stool specimens and horseradish peroxidase (HRP) labelled monoclonal anti-*Astrovirus*-antibodies are dispensed simultaneously into the wells of a microtitration plate coated with polyclonal anti-*Astrovirus*-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 / \geq 620 nm is directly proportional to the specifically bound amount of *Astrovirus*.

Test components

		For 96 Wells	For 2x 96 Wells	
1	WELLS	Microtitration plate coated with polyclonal anti- <i>Astrovirus</i> -antibodies (sheep)	12 single breakable 8-well strips colour coding light blue vacuum-sealed with desiccant	2x 12 single breakable 8-well strips colour coding light blue 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>Astrovirus</i> reactive sample	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>Astrovirus</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- <i>Astrovirus</i> -antibodies	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 48 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*[®] Astrovirus 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 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 + 0.10

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 *Astrovirus* antigen.

Reference values

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 ≤ 0.15 (manual test performance)
 ≤ 0.30 (automatic test performance)
- the mean OD of the positive control is ≥ 1.00

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 an *Astrovirus* 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. A final interpretation of the test results should consider clinical findings as well.

Automatic Processing

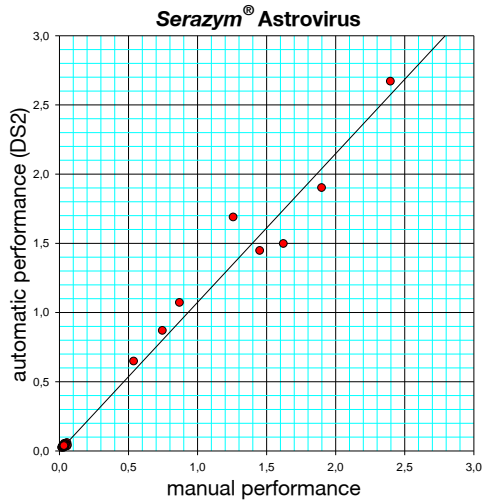
Performing the *Serazym*[®] Astrovirus on fully automated microplate processors (e.g. DS2, DSX) may cause elevated absorbances in comparison to the manual procedure due to individual differences concerning wash procedures and general technical specifications of the equipment. In these cases a maximum value of 0.3 absorbance units is permissible for the negative control. It is recommended to

<i>Serazym</i>[®] Astrovirus	
Positive	\geq Cut-off
Negative	$<$ Cut-off

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 96 stool specimens was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with $r = 0.993$.



Performance characteristics

Precision

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

sample	mean absorbance	standard deviation	CV (%)
1	1.667	0.148	8.9
2	0.994	0.063	6.4
3	0.443	0.027	6.1
4	0.185	0.018	9.8

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

sample	mean absorbance	standard deviation	CV (%)
1	1.853	0.071	3.8
2	1.019	0.059	5.8
3	0.583	0.069	11.9
4	0.350	0.034	9.7

Lower detection limit

The lower detection limit of *Astrovirus* antigen in the *Serazym®* Astrovirus was determined by titration of purified *Astrovirus*-antigen. Lower detection limit: 6 ng / ml.

Specificity and sensitivity

A total of 98 stool samples were investigated in parallel in the *Serazym®* Astrovirus and in another commercially available ELISA.

	comparative ELISA positive	comparative ELISA negative
<i>Serazym®</i> ELISA positive	49	0
<i>Serazym®</i> ELISA negative	2	47

Specificity: 100% Sensitivity: 96%

Cross reactivity

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

Rotavirus (n = 10), *Adenovirus* (n = 20), *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 sulphate (5%), Buscopan[®] (2 mg/ml), cyclamate (5%), Diclofenac (2 mg/ml), haemoglobine (5 mg/ml), Hylak[®] N (5%), Immodium[®] akut duo (0.2/12.5 mg/ml), Iberogast[®] (5%), 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%).

* The addition of 5% (v/v) Hylak[®] N (lactic acid containing preparation against digestive complaints) to Astrovirus positive stool suspensions may decrease OD values.

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 are 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
2020-07-21	Intended use	Correction
	Test Components	Correction
	Assay Procedure	Update
	Common Advices and Precautions	Update
	History of Changes	New section "History of Changes"

Incubation scheme *Serazym*[®] Astrovirus (E-045)

1.  2 drops (or 75 µl) **CONJ HRP** (6)
 +
 pipette
 75 µl **CONTROL +** (4)
 75 µl **CONTROL -** (5)
 50 µl **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	

