

Serazym[®] Norovirus

Enzymimmunoassay zum Nachweis von *Norovirus* in Stuhlproben

REF E-061 ▽ 96 REF E-061-A2 ▽ 2x 96 IVD *In-vitro*-Diagnostikum CE



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

Einführung

Noroviren gehören zur Familie der *Caliciviridae*, 30 - 40 nm große einzelsträngige RNA-Viren mit charakteristisch kelchförmig aus Untereinheiten zusammengesetztem Kapsid. Innerhalb der *Caliciviridae* enthält die Gattung Norovirus die beiden humanpathogenen Genogruppen GGI und GGII mit jeweils mindestens 15 und 18 verschiedenen Genotypen. Die genetische Heterogenität der Noroviren äußert sich in einer hohen Divergenz der Kapsidproteine sowohl zwischen den Genogruppen (ca. 60%) als auch zwischen den Genotypen innerhalb einer Genogruppe (ca. 20 - 30%). Seit 1995 hat sich GGII.4 als prädomanter zirkulierender Genotyp durchgesetzt. Noroviren sind sehr umweltresistent und hochkontagiös. Die Infektion des Menschen erfolgt durch direkten Kontakt zu Infizierten (fäkal-orale Schmierinfektion oder Aufnahme von Aerosolen von Erbrochenem) oder über kontaminierte Nahrungsmittel, Trinkwasser oder Gegenstände. Nach einer kurzen, nur 10 - 50 Stunden dauernden Inkubationszeit kommt es zu den charakteristischen fulminanten Durchfällen mit teils explosionsartigem Erbrechen. Die Infektion verläuft in der Regel selbstlimitierend und die Symptome klingen nach ca. 2 - 3 Tagen wieder ab. Norovirusinfektionen unterliegen jahreszeitlichen Schwankungen mit einem Gipfel in den Wintermonaten. Sie gelten als häufigste Ursache von Ausbrüchen nicht-bakterieller Gastroenteritiden weltweit, sind aber auch für Einzelfälle viral bedingter Gastroenteritiden verantwortlich. Die hohe Sequenzvariabilität der Kapsidproteine verhindert die Bildung protektiver Antikörper und erschwert den diagnostischen Nachweis. Als labordiagnostische Nachweismethoden werden die PCR (meist als Real time Reverse Transcriptase PCR- Rt RT-PCR) und der Enzymimmunoassay eingesetzt.

Literatur:

1. Venkataram, B.V. et al. (1999): "X-ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid" *Science* Vol 286: 287-290.
2. Künkel, U. und Schreier, E. (2002): "Caliciviren-Virale Auslöser akuter Gastroenteritiden" *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 45: 534-542.
3. Hansman, G.S. et al. (2006): "Genetic and antigenic diversity among noroviruses" *Journal of General Virology* 87:909-919.
4. Marshall, J.A. and Bruggink, L.D. (2006): "Laboratory Diagnosis of Norovirus" *Clin. Lab.* 52: 571-581
5. Tomoyuki Shiota et al. (2007): "Characterization of a Broadly Reactive Monoclonal Antibody against Norovirus Genogroups I and II: Recognition of a Novel Conformational Epitope" *Journal of Virology*, Vol. 81, No. 22, p.12298-12306.
6. Lindesmith, L.C. et al. (2008): „Mechanisms of GII.4 Norovirus Persistence in Human Populations“ *PLoS Medicine* Vol 5 (2): 269-289

Anwendungsbereich

Der *Serazym*[®] Norovirus ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum direkten Nachweis von *Norovirus* Antigenen in Stuhlproben.

Testprinzip

Der *Serazym*[®] Norovirus ist ein direkter Zwei-Seiten-Assay auf der Basis polyklonaler Antikörper gegen Norovirus Kapsidproteine der Genogruppen GGI und GGII. Verdünnte unbehandelte Stuhlproben sowie negative und positive Kontrollproben werden, in die mit polyklonalen anti-Norovirus Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach der Inkubation werden die ungebundenen Komponenten durch einen Waschschrift entfernt und Peroxidase (POD)-markierte polyklonale anti-Norovirus-Antikörper in die Kavitäten dispensiert. Nach erneuter Inkubation und einem weiteren Waschschrift setzt die POD im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung in ein blaues Endprodukt um. Diese Reaktion wird nach der Inkubation durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die bei 450 nm / \geq 620 nm gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Norovirus-Antigene direkt proportional. Unter Berücksichtigung des errechneten Cut-Off Wertes wird das Ergebnis als positiv oder negativ bewertet.

Testkomponenten

		Für 96 Kavitäten	Für 2x 96 Kavitäten	
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit polyklonalen anti-Norovirus-Antikörpern (Schaf)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung silber vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung silber 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 Rekombinante Norovirus Kapsidproteine	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe	4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL -	Negative Kontrolle Norovirus negative Probe	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe	4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6	CONJ HRP	POD-Konjugat POD-markierte polyklonale anti-Norovirus-Antikörper (Schaf)	15 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt braune Kappe	25 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 werden, oder bei -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Proben, die im *Serazym*[®] Verdünnungsmedium verdünnt wurden, können bis zu 72 h bei 2...8°C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

Vorbereitung und Verwendung

Stuhlproben gut durchmischen. 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

Stuhlproben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 6 verdünnen, z.B. 200 mg oder 200 µl Stuhlprobe + 1,0 ml 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. Je 100 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
100 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
100 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren.
3. Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
4. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** POD-Konjugat (6) pro Kavität.
6. Platte abkleben und 30 min bei RT inkubieren.
7. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
9. 10 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
10. 3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
11. 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 + 0,10

Proben mit OD-Werten, die über oder gleich der errechneten Grenzwert OD liegen sind als positiv, Proben mit OD-Werten unterhalb des errechneten Grenzwertes sind als negativ im *Serazym*[®] Norovirus zu bewerten.

Referenzwert

<i>Serazym</i> [®] Norovirus	
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: ≤ 0,20 (manuelle Abarbeitung)
≤ 0,30 (automatische Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der Positiven Kontrolle ≥ 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

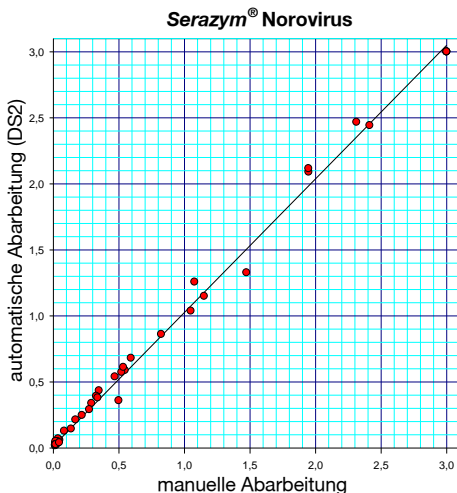
Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von *Norovirus* Antigenen in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle in Korrelation gesetzt werden. Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien 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 *Serazym*[®] Norovirus schließt eine Infektion nicht aus. Ursachen falsch negativer Ergebnisse können einerseits durch einen ungünstigen Zeitpunkt der Probenahme und andererseits durch eine inhomogene Antigenverteilung in der Probe bedingt sein. Es ist bekannt, dass genetische Rekombinationen zwischen verschiedenen Norovirusstämmen zur Variabilität der Antigeneigenschaften führen können (antigenic shift). Dadurch können Virusvarianten entstehen, die im ELISA falsch negative Ergebnisse verursachen können. Die Gesamtinterpretation des ELISA-Testergebnisses sollte im Zusammenhang mit der Klinik erfolgen.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Serazym*[®] Norovirus auf einem Mikrotitrationsplatten-Vollautomaten (wie z.B. DS2 oder 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 90 Stuhlproben in manueller und automatischer Abarbeitung (DS2, Dynex Technologies) konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,999 ermittelt werden.



Leistungsmerkmale

Präzision

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

Probe	Extinktions-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	2,132	0,043	2,00
2	0,902	0,035	3,93
3	0,534	0,017	3,28
4	0,217	0,013	5,92

Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym®* Norovirus in 8 verschiedenen Testläufen an zwei verschiedenen Tagen aus 8-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	Extinktions-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	1,924	0,146	7,59
2	0,813	0,026	3,17
3	0,562	0,021	3,74
4	0,247	0,007	2,76

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze des *Serazym®* Norovirus wurde mit < 10 ng / ml Kapsidprotein bezogen auf Genogruppe I und II durch Titration rekombinanter Kapsidproteine bestimmt.

Spezifität und Sensitivität

Im Rahmen einer Vergleichsuntersuchung wurden 159 Stuhlproben getestet. Die Vergleichsuntersuchung erfolgte retrospektiv parallel im *Serazym®* Norovirus und einem anderen kommerziellen ELISA.

	Vergleichs ELISA positiv	Vergleichs ELISA negativ
<i>Serazym®</i> ELISA positiv	111	3
<i>Serazym®</i> ELISA negativ	6	39

Spezifität: 92,9% Sensitivität: 94,9%

Kreuzreaktivität

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

Adenovirus (n = 6), *Astrovirus* (n = 8), *Rotavirus* (n=6), *Clostridium difficile* (n=8), *Campylobacter jejuni* (n=6), *Helicobacter pylori* (n=5), *Giardia lamblia* (n=8), *Cryptosporidium parvum* (n=7), *Entamoeba histolytica/dispar* (n=6).

Negative Stuhlsuspensionen wurden mit folgenden Mikroorganismen mit einer Keimzahl von $\geq 10^8$ Kolonie bildenden Einheiten bzw. Viruspartikeln pro ml Stuhlsuspension aufgestockt und im *Serazym*[®] Norovirus negativ getestet (OD 450 / 620nm < Cut-Off):

<i>Adenovirus</i>	Typ 41
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966
<i>Astrovirus</i>	Serotyp 4
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 117788
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291
<i>Candida albicans</i>	klinisches Isolat
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
<i>Clostridium sordelli</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 pneumonia</i>	ATCC 13883

<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC 27337
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
<i>Rotavirus</i>	Stamm SA11
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>thyphimurium</i>	ATCC 14028
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>galolyticus</i>	ATCC 13076
<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 cholerae</i>	RV 2011/ST5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:9	klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:3	klinisches Isolat

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 (5%), 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), Simigel[®] (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*[®] 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!



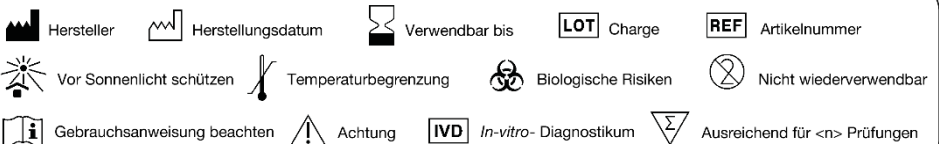
Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2021-02-02	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung
	Änderungshistorie	Einführung des Abschnittes "Änderungshistorie"
	Testkomponenten	Aktualisierung
	Testdurchführung	Aktualisierung

Inkubationsschema *Serazym*[®] Norovirus (E-061)

1.  100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren
 60 min Inkubation (Raumtemperatur)
 5 x Waschen mit Waschlösung
2.  3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** (6)
 30 min Inkubation (Raumtemperatur)
 5 x Waschen mit Waschlösung
3.  3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur)
4.  3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** (8)

Messung der OD bei 450 / \geq 620 nm



Serazym[®] Norovirus

Enzyme immunoassay for detection of *Norovirus* in stool specimens

REF E-061 ▽ 96 REF E-061-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

Noroviruses belong to the family *Caliciviridae*, single stranded RNA viruses of 30 - 40 nm in size characterized by a typical cup-shaped capsid. Within the genus *Norovirus* the two human pathogenic genogroups GGI and GGII have been identified. GGI and GGII strains can be further subclassified into at least 15 and 18 genotypes resp. The genetic heterogeneity of Noroviruses causes distinct capsid protein divergences between different genogroups (about 60%) as well as between different genotypes within one genogroup (about 20 - 30%). Since 1994 genotype GGII.4 is predominantly circulating. Noroviruses are very resistant to environmental conditions and highly contagious. The infection is transmitted by direct contact to already infected people either by faecal-oral transmission or by ingestion of aerosols from vomit or by contaminated food, drinking water or objects. After a short, 10 - 50 hours lasting incubation time fulminant diarrhea and often vomiting develop as the characteristic symptoms. The infection is usually self-limiting and symptoms disappear after 2 - 3 days. Norovirus infections are characterized by seasonal fluctuations with a climax during the winter months. They are considered as the most common cause of non-bacterial gastroenteritis outbreaks worldwide, but may also be responsible for single cases of viral gastroenteritis. The high sequence variability of the capsid proteins circumvents the production of protective antibodies and hampers diagnostic detection. Methods like PCR (usually as "Real time Reverse Transcriptase PCR – Rt RT-PCR) and enzyme immunoassay are commonly used for laboratory diagnosis.

References:

1. Venkataram, B.V. et al. (1999): "X-ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid" *Science* Vol 286: 287-290.
2. Künkel, U. und Schreier, E. (2002): "Caliciviren-Virale Auslöser akuter Gastroenteritiden" *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 45: 534-542.
3. Hansman, G.S. et al. (2006): "Genetic and antigenic diversity among noroviruses" *Journal of General Virology* 87:909-919.
4. Marshall, J.A. and Bruggink, L.D. (2006): "Laboratory Diagnosis of Norovirus" *Clin. Lab.* 52: 571-581
5. Tomoyuki Shiota et al. (2007): "Characterization of a Broadly Reactive Monoclonal Antibody against Norovirus Genogroups I and II: Recognition of a Novel Conformational Epitope" *Journal of Virology*, Vol. 81, No. 22, p.12298-12306.
6. Lindesmith, L.C. et al. 2008: „Mechanisms of GII.4 Norovirus Persistence in Human Populations“ *PLoS Medicine* Vol 5 (2): 269-289

Intended Use

The **Serazym® Norovirus** is an *in-vitro*-diagnostic medical device for direct detection of *Norovirus* specific antigens in stool specimens.

Principle Of The Test

Norovirus antigens from stool specimens and the positive control react with polyclonal anti-Norovirus antibodies coated on the solid phase of the microplate. After incubation non-bound material is removed by a washing step. Subsequently bound antigens specifically react with horseradish peroxidase (HRP) labeled polyclonal anti-Norovirus antibodies during a second incubation period. Unbound conjugate is removed by a washing step. HRP converts the subsequently added colourless chromogenic substrate solution (TMB / H₂O₂) 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 *Norovirus* antigens. By means of the calculated cut-off value, results are interpreted either as positive or negative.

Test Components

			For 96 Wells	For 2x 96 Wells
1	WELLS	Microtitration plate coated with polyclonal anti-Norovirus antibodies (sheep)	12 single breakable 8-well strips colour coding silver vacuum-sealed with desiccant	2x 12 single breakable 8-well strips colour coding silver 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 Recombinant Norovirus capsid proteins	2.0 ml · ready to use coloured blue red cap	4.0 ml · ready to use coloured blue red cap
5	CONTROL -	Negative control Norovirus negative sample	2.0 ml · ready to use coloured blue green cap	4.0 ml · ready to use coloured blue green cap
6	CONJ HRP	HRP-conjugate HRP-labelled polyclonal anti-Norovirus antibodies (sheep)	15 ml · ready to use coloured green brown cap	25 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

Warm samples to room temperature and mix thoroughly. 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 spin down floating particles in 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 450 nm filter 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 one 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 : 6, e.g. 200 mg or 200 µl stool + 1.0 ml sample diluent (3) and mix thoroughly on a vortex.

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 direct 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. Pipette: 100 µl **CONTROL +** positive control (4)
100 µl **CONTROL -** negative control (5)
100 µl **diluted stool specimen**.
3. Cover plate and incubate for 60 min at RT.
4. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
5. Dispense 3 drops (or 100 µl) **CONJ HRP** HRP-conjugate (6) per well.
6. Cover plate and incubate for 30 min at RT.
7. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
8. Dispense 3 drops (or 100 µl) **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
9. Incubate for 10 min at RT protected from light.
10. Dispense 3 drops (or 100 µl) **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
11. Read OD at 450 nm / ≥ 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 higher than or equal to the cut-off value are considered positive, samples with OD values below the cut-off value are considered negative for *Norovirus* antigen.

Reference Values

Serazym® Norovirus	
Positive	≥ 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 ≤ 0.20 (manual test performance)
≤ 0.30 (automatic test performance)
- the mean OD of the positive control is ≥ 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 *Norovirus* 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. Genetic recombination between different *Norovirus* strains may cause antigenic shift finally leading to the occurrence of virus variants that are not detected by ELISA. The overall interpretation of the ELISA results should always consider clinical findings.

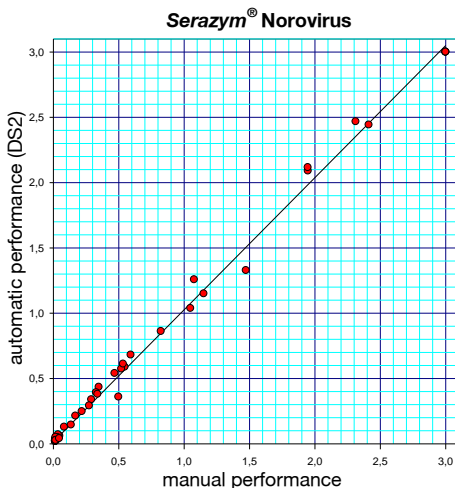
Automatic Processing

Performing the *Serazym®* Norovirus on fully automated microplate processors (e.g. DS2 or 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 90 stool specimens was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with $r = 0.999$.



Performance Characteristics

Precision

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

sample	mean absorbance	standard deviation	CV (%)
1	2.132	0.043	2.00
2	0.902	0.035	3.93
3	0.534	0.017	3.28
4	0.217	0.013	5.92

Inter-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*® Norovirus in 8 different test runs on 2 different days from 8-fold determinations of samples:

sample	mean absorbance	standard deviation	CV (%)
1	1.924	0.146	7.59
2	0.813	0.026	3.17
3	0.562	0.021	3.74
4	0.247	0.007	2.76

Lower detection limit

The lower detection limit of the *Serazym*® Norovirus was determined < 10 ng/ml capsid protein for genogroup I and II.

Specificity and sensitivity

One retrospective study with 159 stool specimens was performed to compare the *Serazym*® Norovirus with another commercially available ELISA.

	comparative ELISA positive	comparative ELISA negative
<i>Serazym</i> ® ELISA positive	111	3
<i>Serazym</i> ® ELISA negative	6	39

Specificity: 92.9% Sensitivity: 94.9%

Cross reactivity

Faecal samples positive for one of the following pathogens did not show any cross reaction in the *Serazym*[®] Norovirus:

Adenovirus (n = 6), *Astrovirus* (n = 8), *Rotavirus* (n = 6), *Clostridium difficile* (n = 8), *Campylobacter jejuni* (n = 6), *Helicobacter pylori* (n = 5), *Giardia lamblia* (n = 8), *Cryptosporidium parvum* (n = 7), *Entamoeba histolytica/dispar* (n = 6).

Negative stool specimens have been spiked with $\geq 10^8$ colony forming units and virus particles per ml stool suspension resp. All microorganisms were tested negative with the *Serazym*[®] ELISA (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

<i>Adenovirus</i>	typ e41
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966
<i>Astrovirus</i>	serotype 4
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 117788
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291
<i>Candida albicans</i>	clinical isolate
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
<i>Clostridium sordelli</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 pneumonia</i>	ATCC 13883

<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC 27337
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
<i>Rotavirus</i>	strain SA11
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>thyphimurium</i>	ATCC 14028
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>galolyticus</i>	ATCC 13076
<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 cholerae</i>	RV 2011/ST5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:9	clinical isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:3	clinical isolate

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 (5%), 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), Simigel[®] (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
2021-02-02	Common Advices and Precautions	Update
	History of Changes	Adding section "History of Changes"
	Test Components	Update
	Assay Procedure	Update

Incubation Scheme *Serazym*[®] Norovirus (E-061)

- | | | | |
|----|---|---------------------------------------|---|
| 1. |  | pipette
100 µl
100 µl
100 µl | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL + (4)</div>
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONTROL - (5)</div>
diluted stool sample |
| |  | 60 min
5 x wash | incubation (room temperature)
with wash solution |
| 2. |  | 3 drops (or 100 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CONJ HRP (6)</div> |
| |  | 30 min
5 x wash | incubation (room temperature)
with wash solution |
| 3. |  | 3 drops (or 100 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">SUBSTR TMB (7)</div> |
| | | 10 min | incubation (room temperature) protected from light |
| 4. |  | 3 drops (or 100 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">STOP (8)</div> |

Read OD at 450 / \geq 620 nm

	Manufacturer		Date of manufacture		Use by	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">LOT</div>	Batch code	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">REF</div>	Catalog number
	Keep away from sunlight		Temperature limits		Biological risks		Do not reuse		
	Consult instructions for use		Caution	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">IVD</div>	<i>In-vitro</i> -diagnostic medical device		Contains sufficient for <n> tests		

