

RIDASCREEN® Rotavirus

REF C0901



1. Zweckbestimmung

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDASCREEN® Rotavirus ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von Rotaviren in humanen Stuhlproben.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Rotaviren sind die wichtigsten Erreger einer nicht-bakteriellen Gastroenteritis bei Kindern im Alter von 6 Monaten bis 3 Jahren. Sie werden aber auch bei älteren Kindern und Erwachsenen als Erkrankungsursache nachgewiesen. In Risikogruppen, d.h. bei Kindern und alten oder immunsupprimierten Patienten, können sie zum Tod führen.

Rotavirus-Infektionen treten gehäuft in den Wintermonaten auf. Endemien und Epidemien mit einigen tausend Erkrankten wurden ebenfalls beschrieben. Bei hospitalisierten Kindern mit akuten Enteritiden sind bis zu 50 % der untersuchten Proben Rotavirus-positiv. Die fäkal-oral übertragenen Rotaviren werden in großen Mengen über den Darm ausgeschieden, so dass nosokomiale Infektionen durch Rotaviren besonders in Säuglingsstationen und Kinderkliniken sehr gefürchtet sind und ihr Management schwierig ist. Ein früher und verlässlicher Nachweis zur Erkennung von Rotaviren und zur Vermeidung weiterer Infektionen ist also sehr wichtig.

Der Nachweis von Rotaviren gelang zuerst durch die elektronenmikroskopische Untersuchung von Stuhlproben und Biopsiematerial des Intestinums - diese Methode gilt heute als Referenzmethode. Die entwickelten *in vitro* Nachweise in Zellkulturen sind schwierig und langwierig; deshalb werden sie nicht routinemäßig zum Rotavirus-Nachweis eingesetzt. Serologische Untersuchungen können nur zur diagnostischen Sicherung einer Rotavirus-Enteritis beitragen, da sich IgM-Antikörper erst ab dem 5. Tage nach Erkrankungsbeginn nachweisen lassen. Eine frühe Diagnosestellung ist hierdurch also nicht möglich.

Der RIDASCREEN® Rotavirus-Test ist als Enzymimmunoassay eine einfache und hoch sensitive Methode, die einen frühen und zuverlässigen Nachweis von Rotavirus-Antigen ermöglicht. Auch größere Probenmengen können in kurzer Zeit bearbeitet werden.

3. Testprinzip

Im RIDASCREEN® Rotavirus-Test werden monoklonale Antikörper in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte ist ein monoklonaler Antikörper gegen das Produkt des 6. viralen Gens (VP6) gebunden. Dabei handelt es sich um ein gruppenspezifisches Antigen, das bei allen humanpathogenen Rotaviren vorkommt. Eine Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe sowie die Kontrollen werden zusammen mit biotinylierten monoklonalen Anti-Rotavirus-Antikörpern (Konjugat 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) zur Inkubation in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einem Waschschrift

wird Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat (Konjugat 2) dazu gegeben und erneut bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert. Bei Anwesenheit von Rotaviren in der Stuhlprobe bildet sich ein Sandwich-Komplex aus immobilisierten Antikörpern, den Rotavirus-Antigenen und den mit dem Biotin-Streptavidin-Poly-Peroxidase-Komplex konjugierten Antikörpern. Nicht gebundenes Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat wird in einem weiteren Waschschritt entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration der in der Probe vorhandenen Rotaviren.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte, 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit monoklonalen Antikörpern (Maus) gegen Rotaviren
Diluent 1	100 ml	Probenverdünnungspuffer 1, Protein-gepufferte NaCl-Lösung; gebrauchsfertig; blau gefärbt
Wash buffer	100 ml	Waschpuffer, Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (10-fach konz.); enthält 0,1 % Thimerosal
Control +	2 ml	Positivkontrolle; inaktivierte Rotaviruskultur; gebrauchsfertig; rot-rosa gefärbt
Control -	2 ml	Negativkontrolle; negative Kontrolle (Probenverdünnungspuffer 1); gebrauchsfertig
Conjugate 1	13 ml	Biotin-konjugierte monoklonale Antikörper (Maus) gegen Rotaviren; gebrauchsfertig; grün gefärbt
Conjugate 2	13 ml	Streptavidin-Poly-Peroxidase Konjugat in stabilisierter Proteinlösung gebrauchsfertig; orange gefärbt
Substrate	13 ml	Wasserstoffperoxid/TMB; gebrauchsfertig
Stop	12 ml	Stopp-Reagenz; 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig

Gefahrstoffangabe gemäß Kennzeichnungspflicht. Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) auf www.r-biopharm.com.

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung bei 2 - 8 °C 4 Wochen haltbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, sodass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.

Eine direkte Lichteinwirkung auf das Substrat ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

6.1 Benötigte Reagenzien

Folgende Reagenzien werden für die Durchführung des RIDASCREEN® Rotavirus Tests benötigt:

Reagenzien
Destilliertes oder deionisiertes Wasser

6.2 Benötigtes Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Durchführung des RIDASCREEN® Rotavirus Tests benötigt:

Zubehör
Probenröhrchen
Einwegpipetten (Art. Nr.:Z0001)
Vortex Mixer (optional, siehe 9.3.)
Mikropipette für 50 - 100 µl und 1 ml Volumina
Messzylinder (1000 ml)
Stoppuhr
Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter 620 - 650 nm)
Filterpapier (Labortücher)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren, Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Proben persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) auf www.r-biopharm.com.

Die im Kit befindliche Positivkontrolle enthält inaktivierte Rotavirus-Kultur. Sie sollte, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den nationalen Sicherheitsbestimmungen behandelt werden.

Der Waschpuffer enthält als Konservierungsmittel 0,1 % Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Stuhlproben müssen so bald als möglich nach Auftreten von Durchfallssymptomen innerhalb von 3 Tagen gewonnen werden. Das Untersuchungsmaterial ist bis zur Verarbeitung bei 2 - 8 °C zu lagern. Kann das Material nicht innerhalb von 3 Tagen im Test eingesetzt werden, wird eine Lagerung bei - 20 °C oder kälter empfohlen. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden. Eine im Probenverdünnungspuffer 1:11 verdünnte Stuhlprobe ist bei 2 - 8 °C bis zu 3 Tagen haltbar (Tab. 1).

Tab. 1: Probenlagerung

Unverdünnte Stuhlprobe		Verdünnte Stuhlprobe
2 - 8 °C	≤ - 20 °C	2 - 8 °C
≤ 3 Tage	> 3 Tage	≤ 3 Tage

Stuhlproben oder Rektalabstriche sollten nicht in Transportbehältern gesammelt werden, die Transportmedien mit Konservierungsstoffen, tierischen Seren, Metallionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien enthalten, da Interferenzen mit dem RIDASCREEN® Rotavirus-Test auftreten können.

Wenn rektale Abstriche eingesetzt werden sollen, ist darauf zu achten, dass genügend Stuhlmaterial (ca. 100 mg) zur Testdurchführung vorhanden ist.

Bei Umgebungsuntersuchungen sollten auch Stuhlproben von klinisch unauffälligen Kontaktpersonen getestet werden, um asymptomatische Träger zu identifizieren.

9. Testdurchführung

9.1 Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte **Plate** auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch sind die Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Beutel) und die Reagenzien wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind.

Ein direkter Kontakt von Proben mit den Kitkomponenten ist zur Vermeidung von Kreuzkontamination zu vermeiden.

Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung sollte vermieden werden. Es wird empfohlen, die Mikrotiterplatte zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten abzudecken oder abzukleben.

9.2 Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates **Wash buffer** wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

9.3 Vorbereitung der Proben

In ein gekennzeichnetes Teströhrchen wird 1 ml RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent | 1** vorgelegt. Flüssiger Stuhl wird in eine Einwegpipette (Art. Nr. Z0001) bis kurz oberhalb der zweiten Markierung aufgesaugt (ca. 100 µl) und im vorgelegten Puffer suspendiert. Bei festem Stuhl wird eine äquivalente Menge Stuhl (ca. 50-100 mg) mit einem Spatel oder einer Einwegimpföse entnommen und suspendiert.

Das Homogenisieren der Stuhlsuspension erfolgt entweder durch Aufsaugen und Ausstoßen mit der Einwegpipette oder alternativ durch Mischen auf einem Vortex Mixer. Nach kurzem Stehenlassen (10 min) zur Sedimentation grober Stuhlpartikel kann der auf diese Weise geklärte Überstand der Stuhlsuspension direkt im Test eingesetzt werden. Erfolgt die Testdurchführung in einem ELISA-Automaten muss dieser Überstand partikelfrei sein. In diesem Fall empfiehlt sich eine Zentrifugation bei 2500 g für 5 Minuten.

Hinweis: Die im **Diluent | 1 verdünnten Stuhlproben können auch in allen anderen RIDASCREEN® ELISA eingesetzt werden die ebenfalls das **Diluent | 1** verwenden.**

9.4 Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen erfolgt die Zugabe von 100 µl der Positivkontrolle **Control | +**, der Negativkontrolle **Control | -** oder der Stuhlprobensuspension in die Vertiefungen. Anschließend werden 100 µl des Biotin-konjugierten Antikörpers **Conjugate | 1** zugegeben und nach Durchmischung (leichtes Tippen an den Plattenrand) für 60 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

9.5 Waschen

Sorgfältiges Waschen ist wichtig zur Erzielung korrekter Ergebnisse und sollte daher strikt nach Anleitung erfolgen. Das Inkubat in den Kavitäten sollte zunächst in einen Abfallbehälter entleert und gemäß den behördlichen Vorschriften entsorgt werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5-Mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer **Wash buffer** gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen. Bei der Verwendung von Waschautomaten oder ELISA-Vollautomaten ist die korrekte Einstellung des Gerätes zu beachten bzw. beim Hersteller zu erfragen. Geräte, die R-Biopharm liefert, sind bereits mit validierten Einstellungen und Arbeitsprotokollen programmiert. Um Verstopfungen von Waschnadeln zu vermeiden sollten gemäß der Probenvorbereitung (Punkt 9.3.) nur partikelfreie Stuhlsuspensionen eingesetzt werden. Bei den Waschschrritten muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden.

9.6 Zweite Inkubation

100 µl des Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugates **Conjugate | 2** werden in die Kavitäten pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubiert.

9.7 Waschen

Waschen gemäß Punkt 9.5.

9.8 Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl Substrat **Substrate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm gemessen (optional: 450/620 nm).

Hinweis: Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Substrates verursachen.

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positiv- und Negativkontrolle mitzuführen, um Reagenzienstabilität und korrekte Testdurchführung sicherzustellen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (OD) der Negativkontrolle bei 450 nm kleiner 0,2 (kleiner 0,160 bei 450/620 nm) und der gemessene Wert der Positivkontrolle bei 450 nm oder bei 450/620 nm größer 0,8 ist. Ist der Wert der Negativkontrolle größer 0,2 (0,160) kann dies ein Zeichen für ungenügendes Waschen sein. Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten ein Hinweis auf Reagenzienverfall sein. Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm Distributor.

11. Auswertung und Interpretation

11.1. Berechnung des Grenzwertes

Zur Festlegung des Grenzwertes werden zu der gemessenen Extinktion der Negativkontrolle 0,15 Extinktionseinheiten hinzuaddiert.

$$\text{Cut-off} = \text{Extinktionswert der Negativkontrolle} + 0,15$$

11.2. Testergebnis

Als positiv werden solche Proben beurteilt, deren Extinktionswert mehr als 10 % über dem errechneten Grenzwert liegt.

Als grenzwertig und zu wiederholen werden solche Proben bezeichnet, deren Extinktionswert im Bereich von 10 % oberhalb und unterhalb des Grenzwertes liegt. Fällt eine Wiederholungsuntersuchung mit einer frischen Stuhlprobe wieder in den Graubereich, so ist die Probe als negativ zu beurteilen.

Proben, die mehr als 10 % unter dem errechneten Grenzwert liegen, sind als negativ zu bewerten.

12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® Rotavirus Test weist Antigen von Rotaviren in Stuhlproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Extinktionswertes und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger nicht aus.

Ein negatives Ergebnis schließt eine mögliche *Rotavirus*-Infektion nicht aus. Es kann durch intermittierende Ausscheidung des Virus oder zu geringe Antigenmenge in der Probe verursacht sein. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine Infektion mit *Rotaviren*, sollte eine weitere Stuhlprobe untersucht werden.

Ein grenzwertiges Ergebnis kann durch eine inhomogene Verteilung des Virus in der Stuhlprobe verursacht werden. Deshalb sollte in einem solchen Fall eine zweite Suspension aus der gleichen Probe untersucht werden oder eine weitere Stuhlprobe zur Untersuchung angefordert werden.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Testqualität

Der RIDASCREEN® Rotavirus wurde im Vergleich zu drei kommerziellen Rotavirus ELISA validiert. Das verwendete Probenkollektiv war zusammengestellt aus tagesfrischen Proben eines Routinelabors und aus asservierten Proben, die zuvor bei -20 °C für die Vergleichsuntersuchung eingefroren waren. Aus einer homogenen Ausgangssuspension wurde alle ELISA nach Herstellervorschrift durchgeführt. Als positiv oder negativ galt eine Probe, wenn zwei der drei Referenzteste übereinstimmten. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Korrelation des RIDASCREEN® Rotavirus ELISA zu 3 weiteren kommerziellen ELISA

RIDASCREEN® Rotavirus	Mitbewerber-ELISA		Total
	+	-	
+	22	1*	23
-	1*	112	113
Total	23	113	136

* Beide Proben waren in der Rotavirus-PCR-Untersuchung negativ

Sensitivität : 95,7 % Spezifität : 99,1 %

13.2 Kreuzreaktivität

Verschiedene pathogene Keime des Intestinaltraktes wurden mit dem RIDASCREEN® Rotavirus ELISA untersucht und zeigten keine Kreuzreaktivität. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit Bakteriensuspensionen, die eine Konzentration von 10^6 bis 10^9 Organismen pro ml aufwiesen. Viruskulturüberstände und Toxine sowie Stuhlproben sind entsprechend deklariert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tab. 3: Kreuzreaktionen mit pathogenen Mikroorganismen

Testkeim	Herkunft	Quelle	[OD 450 nm] Mittelwert
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Kultur	DSM 2403	0,078
<i>Aeromonas hydrophila anaerogenes</i>	Kultur	DSM 30020	0,068
<i>Aeromonas hydrophila hydrophila</i>	Kultur	DSM 30016	0,078
<i>Citrobacter sp.</i>	Kultur	DSM 30047	0,055
<i>Citrobacter freundii</i>	Kultur	DSM 30039	0,090
<i>Enterobacter cloacae</i>	Kultur	DSM 30054	0,072
<i>Enterococcus faecalis</i>	Kultur	DSM 2570	0,066
<i>Enterococcus faecium</i>	Kultur	DSM 20477	0,095
<i>E. coli</i>	Kultur	LMU Munich	0,069
<i>E. coli</i>	Kultur	LMU Munich	0,082
<i>E. coli</i>	Kultur	LMU Munich	0,083
<i>E. hermannii</i>	Kultur	DSM 4560	0,054
<i>Lactococcus lactis</i>	Kultur	DSM 20481	0,073
<i>Listeria innocua</i>	Kultur	DSM 20649	0,078
<i>Proteus mirabilis</i>	Kultur	DSM 788	0,053
<i>Proteus mirabilis</i>	Kultur	DSM 4479	0,065
<i>Proteus vulgaris</i>	Kultur	DSM 30119	0,053
<i>Providencia stuartii</i>	Kultur	DSM 6676	0,080
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kultur	DSM 939	0,065
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kultur	DSM 4358	0,061
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kultur	DSM 50124	0,082
<i>Pseudomonas putida</i>	Kultur	DSM 291	0,058
<i>Salmonella agona</i>	Kultur	LMU Münch.	0,097
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Kultur	DSM 4224	0,088
<i>Salmonella infantis</i>	Kultur	LMU Münch.	0,059
<i>Salmonella ohio</i>	Kultur	LMU Münch.	0,061
<i>Salmonella typhimurium</i>	Kultur	DSM 554	0,052
<i>Serratia liquefaciens</i>	Kultur	DSM 4487	0,050

<i>Shigella flexneri</i>	Kultur	DSM 4782	0,063
<i>Shigella sonnei</i>	Kultur	DSM 5570	0,048
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kultur	DSM 20372	0,063
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Kultur	DSM 2134	0,078
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Kultur	DSM 20662	0,079
<i>Streptococcus uberis</i>	Kultur	DSM 20569	0,072
<i>E. coli</i> (O157:H-)	Kultur	LMU Münch.	0,097
<i>E. coli</i> (O116:H21)	Kultur	LMU Münch.	0,074
<i>E. coli</i> (O111:H-)	Kultur	LMU Münch.	0,084
<i>E. coli</i> (O22:H8)	Kultur	LMU Münch.	0,095
<i>E. coli</i> (O26:H11)	Kultur	LMU Münch.	0,086
<i>Candida albicans</i>	Kultur	ATCC 10231	0,082
<i>Salmonella enteritidis</i>	Kultur	DSM 9898	0,065
<i>Campylobacter jejuni</i>	Kultur	DSM 4688	0,054
<i>Campylobacter coli</i>	Kultur	DSM 4689	0,073
<i>Campylobacter fetus</i>	Kultur	DSM 5361	0,064
<i>Helicobacter pylori</i>	Kultur	DSM 4867	0,053
<i>Morganella morganii</i>	Kultur	DSM 6675	0,053
<i>Astrovirus</i>	Kulturüberstand	Micromun	0,055
<i>Astrovirus</i>	Stuhl	TU Dresden	0,080
<i>Adenovirus</i>	Kulturüberstand	Micromun	0,065
<i>Adenovirus</i>	Stuhl	TU Dresden	0,061
<i>H. pylori</i> Probe	Inaktiviertes <i>H. pylori</i> Lysat	Kit control RIDASCREEN® <i>H. pylori</i> FemtoLab	0,082
<i>C. perfringens</i> 50 µg/ml	Toxoid	Kit control <i>C. perfringens</i> Enterotoxin A	0,058
<i>Shigatoxin</i> STX1	Toxoid	Toxin Technology	0,064
<i>Shigatoxin</i> STX2	Toxoid	Toxin Technology	0,073
<i>C. sordellii</i>	Kultur	tgcBiomics	0,060
<i>C. difficile</i>	Kultur	VPI 1640	0,060
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Kultur	Waterborne Inc.	0,052
<i>Campylobacter</i>	Stuhl	Routinelabor	0,042
<i>Giardia lamblia</i>	Stuhl	TI Berlin	0,037
<i>Entamoeba histolytica</i>	Stuhl	TI Berlin	0,049
<i>Salmonella enteritidis</i>	Stuhl	Routinelabor	0,066
<i>Sapovirus</i>	Stuhl	TU Dresden	0,062

13.3 Präzision

Die Reproduzierbarkeit des RIDASCREEN® Rotavirus ELISA wurde mit sechs Referenzen, die den gesamten Messbereich von schwach bis hoch positiv abdecken, durchgeführt.

Zur Bestimmung der Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurden 40 Replikate dieser Referenzen gemessen. Kit 1 wurde dabei mit Referenzcharge 1 (RC 1) und Kit 2 und 3 mit Referenzcharge 2 (RC 2) gemessen. Die Mittelwerte und die Variationskoeffizienten (VK) wurden für alle 3 Lots ermittelt.

Für die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurden die Referenzen an 10 verschiedenen Arbeitstagen mit 2 Läufen am Tag in Duplikaten gemessen. Die Messungen wurden mit 3 Lots und von 3 Technikern durchgeführt.

Die Inter-Lot Reproduzierbarkeit wurde über 2 Lots (Lot 2 und 3) ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Ergebnisse der Reproduzierbarkeit/Präzision des RIDASCREEN® Rotavirus ELISA

Referenz	Mittelwert / VK(%)	Intra-assay			Inter-assay			Inter- lot
		Kit Lot 1 (RC 1)	Kit Lot 2 (RC 2)	Kit Lot 3 (RC 2)	Kit Lot 1 (RC 1)	Kit Lot 2 (RC 2)	Kit Lot 3 (RC 2)	Kit Lot 2-3
1	MW	2,279	2,116	2,300	2,206	1,902	2,035	1,968
	VK (%)	4,82 %	9,38 %	6,86 %	11,78 %	20,30 %	18,33 %	19,42 %
2	MW	1,318	1,311	1,535	1,642	1,273	1,389	1,331
	VK (%)	8,87 %	10,67 %	5,00 %	14,82 %	25,42 %	21,61 %	23,70 %
3	MW	1,265	1,184	1,517	1,483	1,117	1,219	1,168
	VK (%)	9,82 %	13,36 %	5,25 %	15,00 %	22,68 %	21,43 %	22,01 %
4	MW	0,837	0,660	0,853	1,116	0,710	0,781	0,745
	VK (%)	10,26 %	15,12 %	4,53 %	17,26 %	25,81 %	24,37 %	25,36 %
5	MW	0,658	0,544	0,670	0,738	0,548	0,607	0,578
	VK (%)	9,94 %	14,99 %	4,85 %	17,78 %	25,43 %	26,14 %	26,21 %
6	MW	0,373	0,298	0,509	0,532	0,386	0,435	0,411
	VK (%)	9,85 %	15,38 %	7,43 %	17,94 %	28,90 %	27,73 %	28,87 %

13.4 Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze des RIDASCREEN® Rotavirus ELISA wurde ermittelt aus einer Verdünnungsserie einer mittels Immunelektronenmikroskopie (IEM) quantifizierten Stuhlprobe. Die Messungen erfolgten in Triplikaten ausgehend von einem Virustiter von $10,6 \times 10^7$ Partikel pro ml. Die Nachweisgrenze wurde mit $6,63 \times 10^3$ Viruspartikel pro ml Stuhlprobe festgelegt. Die Titrationsreihe ist in Tabelle 5

dargestellt. Es ist zu beachten, dass der positive OD-Wert im ELISA sowohl durch intakte Viruspartikel, aber auch Fragmente des Virus verursacht wird, die in der IEM nicht mitgezählt werden.

Tab.5: Bestimmung der analytischen Sensitivität des RIDASCREEN® Rotavirus ELISA

IEM	RIDASCREEN® Rotavirus	
	Mittelwert [OD 450]	Ergebnis
5,3 x 10 ⁶	4,036	positiv
5,3 x 10 ⁵	4,043	positiv
2,65 x 10 ⁵	4,051	positiv
1,325 x 10 ⁵	4,060	positiv
0,663 x 10 ⁵	3,140	positiv
5,3 x 10 ⁴	2,022	positiv
2,65 x 10 ⁴	0,788	positiv
1,325 x 10 ⁴	0,451	positiv
0,663 x 10 ⁴	0,240	positiv
0,332 x 10 ⁴	0,124	negativ
0,165 x 10 ⁴	0,049	negativ

13.5 Interferierende Substanzen

Die nachfolgend aufgeführten Substanzen zeigten keinen Effekt auf die Testergebnisse, wenn sie in *Rotavirus*-positive und *Rotavirus*-negative Stuhlproben in den angegebenen Konzentrationen eingemischt wurden:










Mucin	5,0 % w/w	Diclofenac	0,00263 % v/w
Humanblut	5,0 % v/w	Cyclamat	5,0 % v/w
Bariumsulfat	5,0 % w/w	Stearinsäure/ Palmitinsäure	40 % w/w (1:1)
Loperamid	5,0 % w/w		
Pepto-Bismol	5,0 % v/w	Metronidazol 0,5 %-ige Lösung	5,0 % v/w

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2017-04-20	Vorversion
2019-07-08	Generelle Überarbeitung 4. Packungsinhalt 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9.2 Herstellung des Waschpuffers 9.5 Waschen

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Plate	Microtiterplatte
Diluent 1	Probenverdünnungspuffer
Wash buffer	Waschpuffer
Control +	Positivkontrolle
Control -	Negativkontrolle
Conjugate 1	Konjugat 1
Conjugate 2	Konjugat 2
Substrate	Substrat
Stop	Stopp-Reagenz

16. Literatur

1. Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., and Brown, F.: Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology Supplement 2. Springer Verlag, New York, pp 140-144 (1992)
2. Estes, M.K. and Cohen, J.: Rotavirus Gene Structure and Function. Microbiological Reviews 53: 410-419 (1989)
3. Bishop, R.F., Davidson, G. P., Holmes, I.H. and Ruck, B.J.: Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. Lancet 1, 149-151 (1974)
4. Kapikian, A.Z., Yolken, R.H., Greenberg, H.B., Wyatt, R.G., Kalica, A.R., Chanock, R. M. and Kim, H.W.: Gastroenteritis viruses. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, 5th Ed., (1980) Lennette, E.H., Schmidt, N.J., Eds. Amer. Pub. Health Assoc., Washington, D.C., 927-996
5. Flewett, T.H. and Woode, G.N.: The Rotavirus. Arch. Virology 57, 1-23 (1978)
6. Steinhoff, M.C: Rotavirus: The first five years. J. Ped. 96, 611-622 (1980)
7. Blacklow, N.R. and Cukor, G.: Viral Gastroenteritis. New England Journal of Medicine 304, 397-406 (1981)
8. Wenman, W.M., Hinde, D., Feltham, S. and Gurwith, M.: Rotavirus Infection in Adults. Results of a Prospective Study. New England Journal of Medicine 301, 303-306 (1979)
9. Cubitt, W.D.: Rotavirus Infection: An Unexpected Hazard in Units Caring for the Elderly. Geriatric Medicine Today 1, 33-38 (1982)
10. Marrie, T.J., Spencer, H.S., Faulkner, R.S., Ethier, J. and Young, C.H.: Rotavirus Infection in a Geriatric Population. Arch. Intern. Med. 142, 313-316 (1982)

11. Coulson, B.S. and Holmes, I.H.: An Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Rotavirus in Faeces of Neonates. *J. Virol. Methods* 8, 165-179 (1984)
12. Hung, T., Wang, Ch., Fang, Z., Chou, Z., Chang, X., Liang, X., Chen, G., Yao, H., Chao, T., Ye, W., Den, S. and Chang, W.: Waterborne outbreak of Rotavirus Diarrhoea in Adults in China caused by a Novel Rotavirus. *Lancet*, 1139-1142 (1984)
13. Cukor, G., Perron, D.M., Hudson, R. and Blacklow, N.R.: Detection of Rotavirus in Human Stools by Using Monoclonal Antibody. *J. Clin. Microol.* 19, 888-892 (1984)
14. Herrmann, J.E., Blacklow, N.R., Perron, D.M., Cukor, G., Krause, P.J., Hyams, J.S., Bar-rett, H.J. and Ogra, P.L.: Enzyme immunoassay with Monoclonal Antibody Enzyme Im-munoassay for Detection of Rotavirus in Stool Specimens. *J. Infect. Dis.* 152, 830-832 (1985)
15. Yolken, R.H.: Enzyme Immunoassays for the Detection of Infectious Antigens in Body Flu-ids: Current Limitations and Future Prospects. *Rev. Infect. Dis.* 4, 35-68 (1982)
16. Eing, B.R. *et al*: Evaluation of Two Enzyme Immunoassays for Detection of Human *Rota-viruses* in *Fecal Specimens*. *J. Clin. Microbiology* 12/2001 p. 4532-4534