

ProSpecT Adenovirus Mikrotiterplatten-Assay

REF R240096



DE

1. ANWENDUNGSBEREICH

Beim ProSpecT™ Adenovirus Mikrotiterplatten-Assay handelt es sich um einen qualitativen Enzymimmunoassay für den Nachweis des Adenovirus in humanen Stuhlproben und infizierten Zellkultur-Monolayern.

2. ZUSAMMENFASSUNG

Adenoviren sind nicht behüllte DNA-Viren ikosaedrischer Symmetrie. Die Familie der Adenoviridae besteht aus zwei Gattungen: der humanen Adenoviren (Mastadenovirus) und der Geflügeladenoviren (Aviadenovirus)¹. Bis heute wurden mindestens 51 Serotypen des Adenovirus entdeckt. Sie werden in sechs Untergruppen, A bis F, eingeteilt und wurden mittels Hämagglutination, Neutralisationstests, DNA-Hybridisierungstests und Restriktionsendonuclease-Analysen adenoviraler DNA identifiziert und charakterisiert^{1,2,3,4,31}.

Humane Adenoviren werden mit einer Vielzahl klinischer Erkrankungen immunkompetenter und immuninkompetenter Patienten in Verbindung gebracht. Dazu gehören Infektionen des Respirationstrakts, der Augenbindehaut und des Magen-Darm-Kanals⁵. Die Infektionen kommen häufig bei Kindern vor und können sporadisch oder epidemisch auftreten. Ungefähr 5 % aller akuten Atemwegserkrankungen bei Kindern und 10 % aller febrilen Erkrankungen und Pneumonien im Kindesalter werden auf Adenovirus-Infektionen zurückgeführt^{3,6,7}. Adenovirus-Infektionen der Augen können zu Pharyngokonjunktivalfieber, Follikelkatarrh oder epidemischer Keratokonjunktivitis führen^{3,8}. Die Adenovirus-Serotypen 40 und 41 werden häufig mit viraler Gastroenteritis bei Kindern in Verbindung gebracht. Zudem wird davon ausgegangen, dass diese Serotypen für etwa 4 bis 15 % aller Nosokomialinfektionen in Pädiatrieabteilungen verantwortlich sind^{9,10}. Bei immuninkompetenten Patienten (z. B. Transplantations- oder AIDS-Patienten) können schwere systemische Infektionen auftreten, die potenziell lebensbedrohlich sind⁹.

Die Labordiagnose von Adenovirus-Infektionen spielt eine wichtige Rolle bei der Patientenversorgung und ermöglicht ein effizientes Management und eine wirksame Kontrolle von Epidemien. Zu den diagnostischen Methoden gehören die direkte Detektion des Virus oder viraler Proteine in klinischen Proben, die Isolation lebender Viren in Zellkultur-Monolayern, die mit Atemwegs-, Bindehaut- oder Stuhlproben inokuliert wurden, oder die Detektion adenovirus-spezifischer Immunglobuline^{3,5}.

Die Isolation von Adenoviren in klinischen Proben ist mit Hilfe kontinuierlicher Zelllinien hauptsächlich epithelialen Ursprungs möglich, einschließlich HeLa-, Hep2-, KB- und 293-Zelllinien, in denen das Adenovirus einen charakteristischen zytopathischen Effekt zeigt^{3,5}. Zur Bestätigung der Identifizierung von Adenovirus-Isolaten wurde eine Reihe von Methoden herangezogen, so z. B. Neutralisationstests, Radioimmunoassays, DNA-Hybridisierung, Elektronenmikroskopie und die elektrophoretische DNA-Typisierung^{11,12,13,14,15}. Diese Methoden sind potenziell komplex, arbeitsintensiv und zeitaufwendig und daher für den Routineeinsatz häufig ungeeignet.

Mit viraler Gastroenteritis in Verbindung gebrachte Adenoviren können mittels Elektronenmikroskopie direkt in Stuhlproben nachgewiesen werden^{11,16}. Die dafür benötigte Instrumentation ist jedoch nur in spezialisierten Laboren vorhanden.

AusjüngererZeitstammenBerichteüberdirekteImmunfluoreszenz- (z. B. IMAGEN Adenovirus) oder Enzymimmunoassays auf der Basis spezifischer monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, die für den Nachweis des Adenovirus in klinischen Proben oder Zellkultur-Monolayern eingesetzt wurden^{15,17,18}.

Enzymimmunoassays sind schnelle, empfindliche und spezifische Methoden für den Nachweis und die Bestätigung von Adenovirus-Isolaten in Zellkultur-Monolayern oder Stuhlproben.

Beim ProSpecT Adenovirus Mikrotiterplatten-Assay handelt es sich um einen Immunoassay für den Nachweis aller humanen Adenovirus-Serotypen in Stuhlproben oder Zellkultur-Monolayern. Der Test beruht auf einem gattungsspezifischen monoklonalen Antikörper für den Nachweis eines Epitops des Adenovirus-Hexon-Antigens, der in allen humanen Serotypen vorkommt¹⁹.

3. TESTPRINZIP

Das ProSpecT Adenovirus Mikrotiterplatten-Assay verwendet einen monoklonalen Antikörper in einem Sandwich-Enzymimmunoassay fester Phase, um einen gattungsspezifischen Hexonepitop des Adenovirus nachzuweisen. Die abbrechbaren Kavitäten sind mit einem adenovirus-spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet. Eine Stuhlsuspension oder eine unverdünnte Zellkulturflüssigkeit wird in die Kavität gegeben und gleichzeitig mit einem adenovirus-spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Das in der Probe vorliegende Adenovirus-Antigen wird zwischen dem Antikörper in der festen Phase und dem enzymkonjugierten Antikörper eingefangen. Nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden die Kavitäten mit Waschpuffer in Arbeitskonzentration gewaschen, um überschüssige Probe und ungebundenen enzymmarkierten Antikörper zu entfernen. Es wird ein Chromogen in die Kavitäten gegeben und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gegenwart eines spezifisch gebundenen, enzymmarkierten Antikörpers in den Kavitäten führt zu einer Farbänderung, die durch die Zugabe von Säure gestoppt wird. Eine Farbintensität, die sich deutlich von der Hintergrundfärbung unterscheidet, zeigt die Gegenwart des Adenovirus-Antigens in der Probe oder Kontrolle an.

4. SYMBOLDEFINITIONEN

Die folgenden Symbole werden in der Produktinformation verwendet.

	Produktcode und Bestellnummer
	Gebrauchsanleitung beachten
	Inhalt ausreichend für „n“ Tests
	Hersteller
	In-vitro-Diagnostikum
	Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung
	Zulässiger Temperaturbereich

5. INHALT

96 - Jedes Kit enthält Material für 96 Bestimmungen. - Die Haltbarkeit des Kits ist auf der Umverpackung angegeben.

Alle Komponenten bei 2-8 °C lagern.

Vor dem Gebrauch alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25 °C) bringen und vorsichtig mischen. Nach dem Gebrauch alle nicht genutzten Reagenzien bei 2-8 °C lagern.

Mit Ausnahme des Waschpuffers werden alle Reagenzien gebrauchsfertig geliefert. Wenn die Reagenzien zur Verwendung mit Mehrkanalpipetten ausgegossen werden, das überschüssige Reagens nicht wieder in die Flasche zurückführen.



Gebrauchsanweisung
Vollpipetten
Mikrotiterplatten-Abdeckung
Inhaltszertifikat
Kurzanleitung

MICROTITRATION PLATE Eine 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte mit zwölf abbrechbaren 8-Kavitäten-Teststreifen, die mit einem adenovirus-spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet sind. Für die Lagerung ungenutzter Kavitäten liegt ein wiederverschließbarer Beutel mit Trockenmittel bei. Die Teststreifen können nach dem ersten Öffnen 16 Wochen lang verwendet werden, vorausgesetzt, sie werden fachgerecht im Beutel aufbewahrt.

Wenn nicht anderweitig angegeben, eine Flasche für jede der folgenden Komponenten:

SAMPLE DILUENT 120 ml Probenverdünnung: Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit antimikrobiellem Mittel und rotem Farbstoff

CONTROL + 4 ml Positivkontrolle: inaktiviertes Adenovirus Typ 7 in Puffer mit antimikrobiellem Mittel

CONTROL - 4 ml Negativkontrolle: Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit antimikrobiellem Mittel und rotem Farbstoff

CONJUGATE 12 ml Konjugat: adenovirus-spezifischer monoklonaler Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, in einer gepufferten Proteinlösung mit antimikrobiellem Mittel und blauem Farbstoff

WASH BUFFER (x10) 120 ml Waschpufferkonzentrat (10fach): phosphatgepufferte Lösung mit antimikrobiellem Mittel und Detergenz

Das 10fach-Waschpufferkonzentrat durch die Zugabe von 1 Teil Konzentrat auf 9 Teile destilliertes oder deionisiertes Wasser verdünnen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Lagerung bei 2-8°C maximal 30 Tage stabil.

SUBSTRATE TMB 12 ml Substrat: 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin in einem leicht sauren Puffer

STOP SOLUTION 12 ml Stopplösung: 0.46 mol/l Schwefelsäure

6. VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD - Nur zur In-vitro-Diagnostik. Personen, die Tests mit diesem Produkt durchführen, müssen in die Durchführung eingewiesen sein und über entsprechende Laborerfahrung verfügen.

Informationen zu potenziell gefährlichen Komponenten dem Sicherheitsdatenblatt (SDS) oder der Produktkennzeichnung entnehmen.

GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Die Positivkontrolle enthält inaktiviertes Adenovirus Typ 7, das sich in Zellkulturen als nicht infektiös erwiesen hat. Die Kontrolle muss jedoch als potenziell infektiöses Material gehandhabt und entsorgt werden.
- Die Stopplösung enthält Schwefelsäure (0.46 mol/l).
- Der Waschpuffer enthält Hautreizstoffe (<1 % v/v). Hautkontakt vermeiden. Einweg-Schutzhandschuhe aus Vinyl oder Nitril tragen.
- Essen, Trinken, Rauchen, Aufbewahren und Zubereiten von Speisen sowie Schminken sind im entsprechend ausgewiesenen Arbeitsbereich verboten.
- Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren.
- Beim Umgang mit klinischen Proben und Reagenzien Einweghandschuhe tragen. Nach dem Arbeiten mit infektiösen Materialien immer die Hände waschen.
- Alle klinischen Proben müssen entsprechend den geltenden gesetzlichen Vorschriften entsorgt werden.
- Die ProSpecT Adenovirus-Reagenzien enthalten ein herstellereigenes antimikrobielles Mittel, das bei Beachtung der normalen Sicherheitsvorkehrungen für das Arbeiten im Labor keine Gefahr für den Anwender darstellt.
- Wegen der Affinität einiger Adenoviren für den Augenbereich ist jeglicher Kontakt der Hände mit den Augen über das gesamte Testverfahren unbedingt zu vermeiden.

ANALYTISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Testkit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf den Etiketten vermerkten Verfalldatums nicht mehr verwendet werden. Die folgenden Reagenzien dürfen nicht gemischt oder ausgewechselt werden, da dies die Leistungsfähigkeit des Tests beeinträchtigen könnte: Platte, Konjugat und Kontrollen.
- Die folgenden allgemeinen Reagenzien können in der ProSpecT-Serie produktübergreifend verwendet werden: Waschpuffer, TMB-Substrat und Stopplösung.
- Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden.
- Bei Verwenden von Tropfflaschen sicherstellen, dass alle Kontrollen und Reagenzien auf die gleiche Art und Weise zugesetzt werden. (Die Leistungsfähigkeit des Kits kann beeinträchtigt werden, wenn eine Kombination aus Pipettierverfahren und Tropfflasche eingesetzt wird.)
- Für alle Proben, Kontrollen und Reagenzien frische Einmalpipetten oder Pipettenspitzen benutzen (falls keine Tropfflasche verwendet wird), um Kreuzkontaminationen von Proben, Kontrollen oder Reagenzien zu vermeiden. Kreuzkontaminationen können zu falschen Ergebnissen führen.
- Um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden, ist zum Verdünnen von Reagenzkonzentraten genutztes deionisiertes oder destilliertes Wasser in sauberen Behältern aufzubewahren.
- Kontamination mit Metallionen und Oxidationsmitteln vermeiden.

- 6.17. Substrat, das vor der Zugabe in die Kavitäten eine blaue Färbung aufweist, darf nicht verwendet werden.
- 6.18. Substrat vor Licht schützen.
- 6.19. Kavitäten dürfen nicht wiederverwendet werden.
- 6.20. Nicht verbrauchter Waschpuffer in Arbeitskonzentration kann bei 2-8 °C maximal 30 Tage lang für den zukünftigen Gebrauch gelagert werden. Nicht benötigte Waschpuffergefäße mit deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen und trocknen lassen.
- 6.21. Waschvorrichtungen, einschließlich automatischer Geräte, dürfen nicht mikrobiell kontaminiert sein. Sie müssen korrekt geeicht sein und entsprechend den Herstelleranleitungen gehandhabt werden.
- 6.22. Bei der Verwendung von Tropfflaschen die Flasche vertikal halten, so dass die Öffnung etwa 5 mm über der Kavität steht. Die Flasche **vorsichtig** drücken und sicherstellen, dass die Tropfen ungehindert in die Kavitäten fallen können, ohne dabei die Seiten der Kavitäten zu berühren. Ein Kontamination der Tropferöffnungen ist stets zu vermeiden.

7. ENTNAHME VON STUHL- UND ZELLKULTURPROBEN
ENTNAHME VON STUHLPROBEN

Stuhlproben sollten nach dem Einsetzen der Symptome so früh wie möglich entnommen werden.

Die Ausscheidung des Adenovirus im Stuhl erreicht bei Gastroenteritispatienten etwa 3 bis 13 Tage nach dem Einsetzen der Symptome den Spitzenwert³.

Stuhlproben für direkte Tests sind in Behälter zu geben, die kein Medium, keine Konservierungsmittel, tierischen Seren, Metallionen, Oxidationsmittel oder Detergenzien enthalten, da alle diese Zusatzstoffe den ProSpecT Adenovirus-Test beeinträchtigen können.

Bei der Entnahme von Rektalabstrichen ist sicherzustellen, dass diese ausreichend Stuhlmaterial zur Herstellung einer 10%igen Stuhlsuspension enthalten (siehe Abschnitt 8 A).

Proben können vor dem Test 8 Tage lang bei 2-8 °C gelagert werden. Die Langzeitlagerung von Stuhlproben ist bei -20 °C möglich.

ENTNAHME VON ZELLKULTURPROBEN

Die Entnahme der Proben ist bei der Diagnose des Adenovirus mittels Zellkultur von entscheidender Bedeutung. Die Proben müssen zu dem Zeitpunkt von der Infektionsstelle entnommen werden, wenn die virale Ausscheidung ihren Spitzenwert erreicht, damit möglichst viel infiziertes Material vorhanden ist. Bindehautabstriche, Nasen- und/oder Rachenabstriche und andere Arten von Abstrichen, die entnommen werden, sind in ein Virustransportmedium zu geben, das im Routinebetrieb für die Virusisolation verwendet wird, und sofort an das Labor zu überstellen. Der optimale Zeitpunkt für die Entnahme der Proben ist so früh wie möglich nach dem Einsetzen der Symptome. Nasopharyngeale Aspirate oder Sekrete sind über eine Ernährungssonde der Größe 8 in einem Schleimabsauger zu sammeln. Der Schleimabsauger und die Sonde sind zur Weiterverarbeitung sofort zum Labor zu senden.

8. VORGEHENSWEISE

IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

Siehe „Inhalt“ in Abschnitt 5.

ERFORDERLICHE ABER NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

Behälter für die Entnahme von Stuhlproben
Saubere Einwegbehälter mit Schraubverschluss (mindestens 3 ml Fassungsvermögen) für die Vorbereitung von Stuhlproben
Sauberes saugfähiges Papier (zum Abklopfen der Mikrotiterplatten)
Präzisions-Mikropipetten mit Einwegspitzen für 50 µl, 100 µl und 1000 µl
Abfallbehälter mit geeignetem frischem Desinfektionsmittel
Stoppuhr
Waschflasche für Waschpuffer
Destilliertes oder deionisiertes Wasser

OPTIONALE, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

Lesegerät für Mikrotiterplatten für den Betrieb bei 450 nm (optional mit einer Referenz bei 620 - 650 nm)
Vortexmischer mit Plattenadapter oder Plattenschüttler/Inkubator
Waschautomat für Mikrotiterplatten oder geeignete Ausrüstung für das Waschen von Teststreifen mit 8 Kavitäten

VORGEHENSWEISE

8.1. Den Beutel öffnen, die erforderliche Anzahl von Teststreifen entnehmen und in einen Teststreifenhalter geben. Eine Kavität für die Negativkontrolle und eine weitere für die Positivkontrolle verwenden. Wenn weniger als 8 Kavitäten benötigt werden, die erforderliche Anzahl von Kavitäten abbrechen und die nicht benötigten Kavitäten wieder in den Beutel mit Trockenmittel geben. **DEN BEUTEL WIEDER FEST VERSCHLIESSEN, UM DEN INHALT VOR FEUCHTIGKEIT ZU SCHÜTZEN UND WIEDER BEI 2-8 °C LAGERN.**

A. VERDÜNNUNG DER STUHLPROBEN

1 ml Probenverdünnung in einen entsprechend gekennzeichneten Behälter geben und damit eine 10%ige Suspension oder Verdünnung der Stuhlprobe herstellen, indem etwa 0.1 g fester Stuhl (kleine erbsengroße Portion) oder etwa 100 µl flüssiger Stuhl mit einer Vollpipette hinzugegeben wird. Gründlich mischen und die Vollpipette für den weiteren Gebrauch im Behälter lassen.

Rektalabstriche in 1 ml Probenverdünnung drehen und den Abstrich dabei gegen die Behälterwand drücken, um das Stuhlmaterial herauszudrücken. Gründlich mischen.

Zuvor in Formalin konservierte Stuhlsuspensionen vor dem Test mit ProSpecT Adenovirus Probenverdünnung auf eine 10%ige Stuhlsuspension verdünnen.

Mit ProSpecT Adenovirus Probenverdünnung suspendierte bzw. verdünnte Proben können vor dem Test bei 2-8 °C bis zu 8 Tage lang gelagert werden.

HINWEIS: In ProSpecT Astrovirus, ProSpecT Rotavirus und ProSpecT Norovirus Probenverdünnung vorbereitete Proben können ebenfalls mit dem ProSpecT Adenovirus-Assay getestet werden. Andere Probenverdünnungen wurden nicht auf ihre Eignung geprüft.

B. VERDÜNNUNG VON ZELLKULTURPROBEN

Zellkulturproben können direkt mit dem ProSpecT Adenovirus-Assay getestet werden. Für Zellkulturen entnommene Proben sollten in die Zelllinien eingimpft werden, die routinemäßig für die Isolation von Adenoviren verwendet werden, z. B. Hep2 oder HeLa. Zellkulturen sind regelmäßig auf zytopathische Effekte zu untersuchen, die für das Adenovirus charakteristisch sind. Für das Adenovirus typische zytopathische Effekte treten normalerweise 2 bis 7 Tage nach der Inokulation auf, in einige Fällen kann es jedoch bis zu 28 Tage dauern, bis diese Effekte zu beobachten sind. Kulturflüssigkeiten von Zellmonolayern, die einen zytopathischen Effekt zeigen, können abgeerntet und mit dem ProSpecT Adenovirus-Assay direkt auf die Gegenwart von Adenoviren getestet werden.

Abgeerntete Zellkulturen bei 2-8 °C lagern und innerhalb von 72 Stunden nach dem Abernten testen. Die Langzeitlagerung abgeernteter Zellkulturen ist bei -20 °C oder kälter möglich.

- 8.2. Jeweils 2 Tropfen (oder 100 µl) verdünnte Probe, Zellkulturflüssigkeit, Negativkontrolle oder Positivkontrolle in unterschiedliche Kavitäten geben. In jede Testreihe sollte mindestens eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle eingeschlossen werden.
- 8.3. Nach der Zugabe aller Proben und Kontrollen 2 Tropfen (oder 100 µl) Konjugat in jede Kavität geben und 20 bis 30 Sekunden lang vorsichtig mischen.
- 8.4. Die Platte abdecken und bei 20-30°C 60 +/- 5 Minuten lang inkubieren.
- 8.5. Den Inhalt durch Schütteln oder Absaugen aus den Kavitäten entfernen. Alle Kavitäten mit verdünntem Waschpuffer (~350 bis 400 µl pro Kavität) gründlich waschen. Die gesamte Flüssigkeit nach dem Waschen durch Schütteln oder Absaugen aus den Kavitäten entfernen. Insgesamt 5 Mal waschen. Den Inhalt der Platte nach dem letzten Waschvorgang durch Ausklopfen auf sauberem Papier oder Absaugen entfernen. Bei Verwendung eines Waschautomaten diesen auf 5 Waschzyklen programmieren. Waschautomaten müssen richtig kalibriert sein, um sicherzustellen, dass die Kavitäten bei jedem Waschvorgang vollständig gefüllt und entleert werden. Die Platte nach dem letzten Waschvorgang umdrehen und auf saugfähigem Papier abklopfen, um Reste des Waschpuffers zu entfernen.
- 8.6. 2 Tropfen (oder 100 µl) Substrat in jede Kavität geben.
- 8.7. Die Platte abdecken und bei 20-30°C 10 +/- 5 Minuten lang inkubieren.
- 8.8. Die Kavitäten können sofort nach der zweiten Inkubation visuell ausgewertet werden (siehe Abschnitte 9 und 10).
- 8.9. Als Alternative die Substratreaktion stoppen, indem 2 Tropfen (oder 100 µl) Stopplösung in jede Kavität gegeben werden. Darauf achten, dass die Kavitäten vor dem Ablesen der Ergebnisse gründlich gemischt werden. Die Färbung ist nach der Zugabe der Stopplösung 30 Minuten lang stabil.
- 8.10. Spektrophotometrisch bei 450 nm auswerten (siehe Abschnitte 9 und 10).

9. QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jeder Testausführung sollte mindestens eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle eingeschlossen werden.

VISUELLE BESTIMMUNG

Alle Kavitäten mit Negativkontrolle müssen farblos sein. Wenn dies nicht der Fall ist, dürfen die Testergebnisse nicht visuell ausgewertet werden.

Die Kavität mit der Positivkontrolle muss eine deutliche blaue Färbung aufweisen, die sie von der Negativkontrolle klar unterscheidet.

Spektrophotometrische Bestimmung

Der Wert der Negativkontrolle oder der Mittelwert aus den Werten der Negativkontrolle darf nicht mehr als 0.150 Absorptionseinheiten betragen.

Der Wert der Positivkontrolle muss über 0.500 Absorptionseinheiten liegen.

10. ERGEBNISSE

VISUELLE BESTIMMUNG

Allen Proben, deren blaue Färbung intensiver ist als die der Negativkontrolle, sind positiv. Alle Proben, deren Färbung gleich oder weniger intensiv ist als die der Negativkontrolle, sind negativ. Kavitäten, in denen sich die Farbintensität beim Vergleich mit der Negativkontrolle nur schwer auswerten lässt, müssen nach der Zugabe von Stopplösung photometrisch ausgewertet werden.

Spektrophotometrische Bestimmung

- 10.1. Die Kavitäten müssen innerhalb von 30 Minuten nach der Zugabe von Stopplösung photometrisch ausgewertet werden.
- 10.2. Den Inhalt der Kavitäten mischen und die Absorption jeder Kavität spektrophotometrisch bei 450 nm bestimmen. Vor der Messung sicherstellen, dass der Boden der Kavitäten sauber ist. Vor der Messung der Platte einen Leerwert gegen Luft bestimmen.
- 10.3. Wenn das Spektrophotometer die Messung einer Referenzwellenlänge (zwischen 620 und 650 nm) ermöglicht, ist eine Messung an zwei Wellenlängen durchzuführen.
- 10.4. Den Cut-off-Wert berechnen, indem der Wert der Negativkontrolle oder der Mittelwert aus mehreren Negativkontrollen um 0.100 Absorptionseinheiten erhöht wird.
- 10.5. Die Testergebnisse auswerten:

Positiv:	Absorptionswert der klinischen Probe > Cut-off-Wert
Negativ:	Absorptionswert der klinischen Probe < Cut-off-Wert
Nicht eindeutig:	Absorptionswert der klinischen Probe liegt 0.010 Absorptionseinheiten innerhalb des Cut-off-Werts. Diese Proben müssen neu getestet oder vom Patienten neu entnommen werden.

11. GRENZEN DER METHODE

- 11.1. Die Gültigkeit der Ergebnisse, die mit dem ProSpecT Adenovirus Mikrotiterplatten-Assay erhalten werden, hängt vom Verlauf der Kontrollreaktionen ab. Weitere Informationen hierzu unter „Qualitätskontrolle“ in Abschnitt 9.
- 11.2. Durch ein negatives Ergebnis kann die Möglichkeit einer Adenovirusinfektion im Patienten nicht ausgeschlossen werden. Wenn das Adenovirus nicht nachgewiesen

werden kann, gibt es dafür mehrere mögliche Ursachen. Dazu gehören die Entnahme der Probe zu einem falschen Zeitpunkt, wenn zu wenige Viren vorhanden sind, Fehler bei der Probenahme, unsachgemäße Handhabung der Proben oder Fehler in der Zellkultur.

11.3. ProSpecT Adenovirus-Assay wird ein gattungsspezifisches Hexon-Antigen nachgewiesen, das in allen humanen Serotypen vorkommt. Der Test kann nicht zum Differenzieren von Serotypen eingesetzt werden.

11.4. Die Reagenzien werden in festen Arbeitskonzentrationen bereitgestellt. Die Leistung des Tests wird beeinträchtigt, wenn die Reagenzien modifiziert oder unter anderen als den in Abschnitt 5 beschriebenen Bedingungen gelagert werden.

11.5. Durch ein negatives Ergebnis für eine Stuhlprobe kann nicht ausgeschlossen werden, dass an anderen Stellen im Körper eine Infektion mit einem nicht enterischen Adenovirus vorhanden ist. Wenn eine Atemwegs- oder Augeninfektion vermutet wird, müssen Proben von der Infektionsstelle gezüchtet werden.

11.6. Alle positiven Ergebnisse müssen in Verbindung mit klinischen Informationen über den Patienten ausgewertet werden, da Adenoviruserkrankungen mit einer Latenzperiode oder Rückfällen verbunden sein können. Eine asymptomatische Ausscheidung des Virus kann bis zu 18 Monate nach der Infektion auftreten²⁰. Enterische Adenoviren können in den Stuhlproben asymptomatischer Kinder vorkommen²¹.

11.7. Der Einsatz des ProSpecT Adenovirus Mikrotiterplatten-Assays für direkte Tests an anderen Proben als Stuhlproben wird nicht empfohlen, da die Gegenwart unzureichender Antigenmengen oder eine fehlerhafte Probenahme zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Ein positives Ergebnis in Stuhlproben weist in Verbindung mit Durchfall mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine adenovirale Gastroenteritis hin¹⁰. Die Adenovirus-Typen 40, 41 und manchmal auch 31 werden in den meisten Fällen mit einer viralen Gastroenteritis in Verbindung gebracht.

11.8. Durch ein positives Ergebnis kann die Gegenwart anderer enterischer Pathogene nicht ausgeschlossen werden. Während die Verbindung zwischen dem Adenovirus und Gastroenteritis als gesichert gilt, ist eine gleichzeitige Infektion mit anderen mikrobiellen Krankheitserregern möglich.

11.9. Mekoniumproben wurden für den Gebrauch mit dem ProSpecT Adenovirus Mikrotiterplatten-Assay nicht untersucht.

11.10. Die Testergebnisse müssen in Verbindung mit epidemiologischen, klinischen und anderen diagnostischen Daten für den Patienten ausgewertet werden²⁰.

12. ERWARTETE WERTE

Die Positivitätsrate ist abhängig von der Prävalenz des Adenovirus in den verschiedenen Populationen, geographischen Lage, Probenahme, dem verwendeten Zellkultursystem sowie der Handhabung, Lagerung und dem Transport der Proben. Auch die allgemeine Gesundheitsversorgung der untersuchten Patientenpopulation ist diesbezüglich von Bedeutung.

Die Häufigkeit der Adenovirusinfektion hängt vom klinischen Syndrom und dem Alter des Patienten ab. Bei Kindern unter 5 Jahren sind ungefähr 5 % aller Fälle von akuter Atemwegserkrankung auf das Adenovirus zurückzuführen²².

Des Weiteren gehen etwa 10 % aller Pneumonien bei Kindern auf das Adenovirus zurück⁶. Akute Fälle von Cystitis haemorrhagica werden bei Kindern in ca. 20 bis 70 % der Fälle vom Adenovirus verursacht^{23,24}. Enterische Adenoviren (Typen 40 und 41) werden für etwa 10 % aller Fälle von pädiatrischer Gastroenteritis als kausativer Organismus verantwortlich gemacht und treten am häufigsten bei Kindern unter 2 Jahren auf¹⁰.

Bei Erwachsenen werden Adenoviren in einigen Fällen für Zervizitis²⁵ und insbesondere bei Soldaten für akute Atemwegserkrankungen verantwortlich gemacht²⁶. Durch Adenoviren verursachte Augeninfektionen wie die epidemische Keratokonjunktivitis und die sog. „Schwimmbad-Konjunktivitis“ können in jeder Altersgruppe auftreten^{27,28}. Alle Gruppen von immunsupprimierten Patienten können am Adenovirus erkranken^{29,30}.

13. LEISTUNGSDATEN SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

ProSpecT Adenovirus Mikrotiterplatten-Assay wurde im Rahmen von klinischen Studien an vier Zentren untersucht. Die Studien wurden mittels Stuhlproben von Gastroenteritis-Patienten und mittels Zellkultur-Monolayer durchgeführt, die mit Proben von Patienten mit vermuteter Adenovirus-Infektion inokuliert wurden. Die mit dem ProSpecT Adenovirus Mikrotiterplatten-Assay erhaltenen Ergebnisse wurden im Fall von Stuhlproben mit Elektronenmikroskopie (EM) und im Fall von Zellkulturproben mit Virusneutralisation verglichen.

Insgesamt wurden 176 Stuhlproben und 153 Zellkulturproben untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 13.1 und 13.2 zusammengefasst.

13.1. Stuhlproben

Bei der Untersuchung von Stuhlproben zeigte der ProSpecT Adenovirus-Test eine Korrelation von 95,5 % (168/176) mit den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie. Sensitivität und Spezifität des ProSpecT Adenovirus-Tests lagen beim Vergleich mit EM insgesamt bei jeweils 90,1 % (64/71) und 99,0 % (104/105).

Tabelle 13.1 Vergleich des ProSpecT Adenovirus-Tests mit Elektronenmikroskopie bei der Untersuchung von Stuhlproben

METHODE	EM	
	+	-
ProSpecT Adenovirus	64	1*
	7**	104
Sensitivität	90,1 %	
Spezifität	99,0 %	
Korrelation	95,5 %	

* Nicht genügend Probenmaterial für die Testwiederholung verfügbar

** In allen Proben wurden mittels Elektronenmikroskopie Viruspartikel nachgewiesen und von 5 Proben wurden Adenovirus-Stämme isoliert (Typen 2, 4 und 5).

13.2. Zellkulturproben

Beim Testen von Zellkulturproben zeigte der ProSpecT Adenovirus-Test eine Korrelation von 98,0 % (150/153) mit Virusneutralisation in Zellkulturen. Sensitivität und Spezifität des ProSpecT Adenovirus-Tests lagen beim Vergleich mit Virusneutralisation insgesamt bei jeweils 97,6 % (82/84) und 98,6 % (68/69).

Tabelle 13.2 Vergleich des ProSpecT Adenovirus-Tests mit Virusneutralisation an Zellkulturisolaten

METHODE	VIRUSNEUTRALISATION	
	+	-
ProSpecT Adenovirus	82	1
	2	68
Sensitivität	97,6%	
Spezifität	98,6%	
Korrelation	98,0%	

NACHWEISGRENZE

Von einer auf Adenovirus positiv getesteten Stuhlprobe, von der die Viruspartikel pro ml mittels Elektronenmikroskopie bestimmt wurden, wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt und mit dem ProSpecT Adenovirus-Test untersucht, um die Nachweisgrenze zu bestimmen (siehe Tabelle 13.3). Die Ergebnisse machen deutlich, dass mit dem ProSpecT Adenovirus-Test Viruspartikel bis hinunter zu $3,0 \times 10^5$ pro ml bestimmt werden können.

Tabelle 13.3 Absorptionswerte (A_{450}) durch die Titration von Stuhlproben, von denen bekannt war, dass sie Adenovirus enthielten

Viruspartikel/ml (EM)	Mittlere Absorption mittels ProSpecT Adenovirus
$1,9 \times 10^7$	1,85
$4,8 \times 10^6$	1,75
$1,2 \times 10^6$	0,84
$5,9 \times 10^5$	0,45
$3,0 \times 10^5$ *	0,21
$7,4 \times 10^4$	0,10

* Endpunktkonzentration des Adenovirus beim Nachweis mit dem ProSpecT Adenovirus-Test

PRÄZISION

Intra Assay-Präzision

Die Intra-Assay-Präzision wurde anhand von drei Stuhlproben und drei Zellkulturproben ermittelt. Jede Probe wurde in einem einzelnen Assay 32 Mal getestet und es wurde der Mittelwert und der Variationskoeffizient berechnet (n=32).

Tabelle 13.4 Intra-Assay-Präzision des ProSpecT Adenovirus-Tests

Probenstatus	Zellkulturproben		Stuhlproben	
	Mittlere AE	VK (%)	Mittlere AE	VK (%)
Negativ	0,05	5,5	0,05	10,8
Positiv	0,36	5,6	0,42	10,5
Positiv	2,89	4,2	2,34	8,4

Inter Assay-Präzision

Die Inter-Assay-Präzision wurde anhand von drei Stuhlproben und drei Zellkulturproben ermittelt. Jede Probe wurde in 12 verschiedenen Assays getestet und es wurden die mittleren Absorptionswerte und der Variationskoeffizient berechnet (n=24).

Tabelle 13.5 Inter-Assay-Präzision des ProSpecT Adenovirus-Tests

Probenstatus	Zellkulturproben		Stuhlproben	
	Mittlere AE	VK (%)	Mittlere AE	VK (%)
Negativ	0,05	7,3	0,05	7,6
Positiv	0,24	8,6	0,33	5,4
Positiv	2,02	5,3	1,75	7,9

KREUZREAKTIVITÄT

Die folgenden Mikroorganismen wurden mit dem ProSpecT Adenovirus-Test negativ getestet. Es wurden Kreuzreaktivitätstests durchgeführt, entweder an klinischen Proben, deren mikrobieller Status bekannt war oder an Laborkulturen bekannter Organismen, die ungefähr 10^7 - 10^8 lebensfähige Organismen pro ml enthielten.

Viren	<i>Legionella spp.</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Coronavirus</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Coxsackie-Virus A16, B2, B3, B4, B5</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Echovirus 9, 11, 22, 32</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Enterovirus</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>
<i>Epstein-Barr-Virus</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Herpes-simplex-Virus, Typ 1 und 2</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>
<i>Influenzavirus A und B</i>	<i>Mycoplasma orale</i>
<i>Kuhpockenvirus</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Masernvirus</i>	<i>Mycoplasma salivarium</i>
<i>Mumpsvirus</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Parainfluenza 1, 2, 3, 4a, 4b</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Poliovirus, Typ 1, 2 und 3</i>	<i>Neisseria meningitidis A, B, C und D</i>
<i>Respiratory-syncytial-Virus</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Rhinovirus</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Rotavirus</i>	<i>Neisseria pharyngis</i>
<i>Schaumvirus</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Sendaiavirus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>SRSV (small round structured virus)</i>	<i>Salmonella agona</i>
<i>Zytomegalovirus</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
Bakterien	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Salmonella virchow</i>
<i>Aeromonas spp.</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Bacillus spp.</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Campylobacter spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Clostridium difficile (Toxin)</i>	<i>Vibrio haemolyticus</i>
<i>Clostridium perfringens (Toxin)</i>	Protozoen
<i>Clostridium spp.</i>	<i>Cryptosporidium sp.</i>
<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Enteropathogene E. coli</i>	Andere Mikroorganismen
<i>Enterotoxinogene E. coli</i>	<i>Candida spp.</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Microsporium spp.</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Trichuris trichiura</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>	

14. LITERATURVERWEISE

- 1. Francki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.L. and Brown F. (1992)**
Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology Supplement 2.
Springer Verlag. New York. pp140-144
- 2. Rosen L. (1960)**
Haemagglutination inhibition technique for typing adenoviruses.
American Journal of Hygiene **71**: 120-128
- 3. Wadell G. (1990)**
Adenoviruses. In Principles and Practice of Clinical Virology (eds A.J. Zuckerman et al) John Wiley and Sons Ltd, p 267-287
- 4. Albert M.J. (1986)**
Enteric Adenoviruses
Archives of Virology **88**: 1-17
- 5. Horowitz M.S. (1985)**
Adenoviral diseases. In Virology (eds B.N. Fields et al) Raven Press New York pp 477-495.
- 6. Mallett R., Ribierre M., Bonnenfant F., Labruno B. and Reyrole L. (1966)**
Les pneumopathies graves à adeno virus.
Archives FR Pediatrics **23**: 1057-1073
- 7. Pacini D.L., Collier A.M. and Henderson F.W. (1987)**
Adenovirus Infections and Respiratory Illness in Group Day Care.
Journal of Infectious Diseases **156**: 920-927
- 8. Ford E., Nelson K.E. and Warren D. (1987)**
Epidemiology of Epidemic Keratoconjunctivitis
Epidemiological Reviews **9**: 244-261
- 9. Madeley C.R. (1986)**
The emerging role of adenoviruses as inducers of gastroenteritis.
Paediatric Infectious Diseases **5**: 563-574
- 10. Uhnou I., Wadell G., Svensson L. and Johansson M.E. (1984)**
Importance of Enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children.
Journal of Clinical Microbiology **20**: 365-372
- 11. Miller S.E. (1986)**
Detection and Identification of Viruses by Electron Microscopy.
Journal of Electron Microscopy Technique **4**: 265-301
- 12. Darougar S., Walpita P., Thaker U., Viswalingham N. and Wishart M.S. (1984)**
Rapid Culture Test for adenovirus isolation.
British Journal of Ophthalmology **68**: 405-408
- 13. Kidd A.M., Harley E.M. and Erasmus M.J. (1985)**
Specific detection and typing of adenovirus types 40 and 41 in stool specimens by dot blot hybridisation.
Journal of Clinical Microbiology **22**: 934-939
- 14. Gomes S.A., Nascimento J.P., Siquera M.M., Krawczuk M.M., Pereira H-G. and Russell W.C. (1985).**
In situ hybridisation and biotinylated DNA probes: a rapid diagnostic test for adenovirus upper respiratory infections.
Journal of Virological Methods **12**: 105-110
- 15. Lehtomaki K., Julkunen I., Sandelin K., Salonen J., Virtanen M., Ranki M. and Hovi T. (1986).**
Rapid diagnosis of respiratory adenovirus infections in young adult men.
Journal of Clinical Microbiology **24**: 108-111
- 16. Wood D.J. and Bailey A.S. (1987)**
Detection of Adenovirus Types 40 and 41 in stool specimens by Immune Electron Microscopy.
Journal of Medical Virology **21**: 191-199

- 17. Pereira H.G., Azeredo R.S., Leite J.P.G., Andrade Z.P. and De Castro L. (1985)**
A combined enzyme immunoassay for Rotavirus and Adenovirus.
Journal of Virological Methods **10**: 20-28
- 18. August M.J. and Warford A.L. (1987)**
Evaluation of a commercial monoclonal antibody for detection of Adenovirus antigen.
Journal of Clinical Microbiology **25**: 2233-2235
- 19. Cepko C.L., Whetstone C.A. and Sharp P.A. (1983)**
Adenovirus hexon monoclonal antibody that is group specific and potentially useful as a diagnostic reagent.
Journal of Clinical Microbiology **17**: 360-364
- 20. Greenburg S.B. and Krilov L. (1986)**
Laboratory diagnosis of viral respiratory disease.
Cumitech, No. 21, ASM Drew W.L., Rubin S.J. editors.
- 21. Cukor G. and Blacklow N.R. (1984)**
Human viral gastroenteritis.
Microbiological Reviews. **48**: 157-179
- 22. Brandt C.D., Kim H.W., Vargosko A.J., Jeffries B.C., Arrobio J.O., Rindge B., Parrott R.H. and Chanock R.M. (1969)**
Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease.
Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome.
American Journal of Epidemiology **90**: 484-500
- 23. Mufson M.A., Belshe R.B., Horrigan T.J. and Zollar L.M. (1973)**
Cause of acute haemorrhagic cystitis in children.
American Journal of Diseases of Children **126**: 605-609
- 24. Numazaki Y., Kumasaka T., Yano N., Yamanaka M., Miyazawa T., Takai S. and Ishida N. (1973)**
Further study on acute haemorrhagic cystitis due to adenovirus type 11.
New England Journal of Medicine **289**: 344-347
- 25. Laverty C.R., Russell P., Black J., Kappagoda N., Benn R.A.V. and Booth N. (1977)**
Adenovirus infection of the cervix.
Acta cytology **21**: 114-117
- 26. Mogabgab W.J. (1968)**
Mycoplasma pneumonia and adenovirus respiratory illnesses in military and university personnel. 1959-1966.
American Review of Respiratory Diseases **97**: 345-358
- 27. Kemp M.C., Hierholzer J.C., Cabradilla C.P. and Obijeski J.F. (1983)**
The changing etiology of epidemic keratoconjunctivitis: Antigenic and restriction enzyme analysis of adenovirus types 19 and 37 isolated over a 10 year period.
Journal of Infectious Diseases **148**: 24-33
- 28. Foy H.M., Cooney M.K. and Hatlen J.B. (1968)**
Adenovirus type 3 epidemic associated with intermittent chlorination of a swimming pool.
Archives Environmental Health **17**: 795-802
- 29. De Jong P.J., Valderrama G., Spigland I. and Horwitz M.S. (1983)**
Adenovirus isolates from urine of patients with acquired immunodeficiency syndrome.
Lancet **1**: 1293-1296
- 30. Siegal F.P., Dikman S.H., Arayata R.B. and Bottone E.J. (1981)**
Fatal disseminated adenovirus 11 pneumonia in an agammaglobulinaemic patient.
American Journal of Medicine **71**: 1062-1067
- 31. Hongju Wu, Igor Dmitriev, Elena Kashentseva, Toshiro Seki, Minghui Wang, and David T. Curiel (2002)**
Construction and characterization of adenovirus serotype 5 packaged by serotype 3 hexon.
Journal of Virology **76** (24): 12775-12782



Oxoid Ltd, Wade Road, Basingstoke, Hants RG24 8PW UK

ProSpecT Adenovirus
IFU X7597B Überarbeitet März 2013