



















Serazym[®] Astrovirus

Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis des Kapsidpolyproteins humanpathogener Astroviren in Stuhlproben humanen Ursprungs

REF	E-045		96
REF	E-045-A2		2x96
IVD	In-vitro-Diagnostikum		CE



Seramun Diagnostica GmbH • Spreenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
 T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

 Eindeutige Produktidentifizierung	 In-vitro Diagnostikum	 Hersteller
 Land der Herstellung und Datum der Herstellung	 Nicht wiederverwenden	 Seriennummer
 Begrenzung der Luftfeuchtigkeit	 Vor Sonnenlicht schützen	 Artikelnummer
 Gebrauchsanweisung beachten	 Verwendbar bis	 Chargennummer
 Ausreichend für <i>n</i> Prüfungen	 Biologisches Risiko	 Temperaturbereich
		 Achtung

Zweckbestimmung

Serazym® Astrovirus ist ein IVD-Test zur qualitativen Bestimmung des Kapsidpolyproteins humanpathogener Astroviren in Stuhlproben humanen Ursprungs durch einen Fachanwender in Laborumgebung.

Er dient der Diagnosehilfe einer Astrovirus-assoziierten Gastroenteritis in Proben von Patienten mit Symptomen einer Gastroenteritis.

Der Test darf nicht angewendet werden mit Probenmaterialien wie Biopaten, Kultursuspensionen und anderen Materialien als Stuhlproben humanen Ursprungs, zu Diagnose, Überwachung, Prognose, Vorhersage, Screening, als therapiebegleitendes Diagnostikum, in patientennaher Umgebung und durch Laienanwender.

Testprinzip

Serazym® Astrovirus ist ein Enzymimmunoassay auf der Basis polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen Astrovirus-spezifische Antigene. Verdünnte, unbehandelte Stuhlproben sowie Negativ- und Positivkontrolle werden simultan mit Peroxidase (HRP)-markierten monoklonalen anti-Astrovirus-Antikörpern in die mit polyklonalen anti-Astrovirus-Antikörpern beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatte dosiert. Nach Inkubation werden ungebundene Komponenten durch einen Waschschritt entfernt und die HRP setzt im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung in ein blaues Reaktionsprodukt um. Diese Reaktion wird nach Inkubation durch Zugabe der Stopplösung beendet, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die bei 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Astrovirus-Antigene direkt proportional.

Testkomponenten (Lieferumfang)

		Für 96 Kavitäten	Für 2x 96 Kavitäten	
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit polyklonalen anti- Astrovirus- Antikörpern (Schaf)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten, Farbmarkierung hellblau, vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten, Farbmarkierung hellblau, vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF (10x)	Waschpuffer (10x) Seramun® Wash buffer A TRIS-basierter Puffer	100 mL Konzentrat für 1000 mL Lösung, farblos, weiße Kappe	2x 100 mL Konzentrat für 2x 1000 mL Lösung, farblos, weiße Kappe
3	DIL	Probenpuffer Seramun® Sample diluent A Phosphat-basierter Puffer	100 mL, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, schwarze Kappe	2x 100 mL, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, schwarze Kappe
4	CONTROL +	Positivkontrolle Astrovirus-positive Probe	1,5 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt, rote Kappe	3,0 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL -	Negativkontrolle TRIS-basierter Puffer	1,5 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt, grüne Kappe	3,0 mL, gebrauchsfertig, blau gefärbt grüne Kappe

6	CONJ HRP	HRP-Konjugat HRP-markierte monoklonale anti- Astrovirus- Antikörper (Maus)	12 mL, gebrauchsfertig, grün gefärbt, braune Kappe	24 mL, gebrauchsfertig, grün gefärbt, braune Kappe
7	SUBSTR	Substrat SeramunBlau® automat fast < 0,1 % 3,3',5,5'- Tetramethyl- benzidin; < 0,05 % Wasserstoffperoxid	15 mL, gebrauchsfertig, farblos, blaue Kappe	28 mL, gebrauchsfertig, farblos, blaue Kappe
8	STOP	Stopplösung SeramunBlau® stop 0,25 M Schwefelsäure	15 mL, gebrauchsfertig, farblos, gelbe Kappe	28 mL, gebrauchsfertig, farblos, gelbe Kappe
9	COVER	Abdeckfolie	1 Stück	-
10		Analysenzertifikat	1 Stück	1 Stück
11		Gebrauchs- anleitung	1 Stück	1 Stück

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette • 8-Kanal-Mikropipette bzw. Multikanal-Mikropipette mit Pipettenspitzen • 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät • Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter • deionisiertes Wasser • Messzylinder • Teströhrchen für die Probenverdünnung

Wichtige Hinweise



Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* diagnostischen Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden.

Die Gebrauchsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck und seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Komponenten aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nur für die Komponenten Waschpuffer (10x), Probenpuffer, Substrat und Stopplösung erlaubt.

Der Waschpuffer (10x), der Probenpuffer, die Substrat- und die Stopplösung können darüber hinaus parameterübergreifend für die Serazym® Stuhlteste Adenovirus (E-017), Astrovirus (E-045), Campylobacter (E-093), Clostridium difficile GDH (E-107), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Cryptosporidium parvum (E-039), Entamoeba histolytica (E-018), Giardia (E-106), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Norovirus (E-061) und Rotavirus (E-020) eingesetzt werden.

Alle im Zusammenhang mit Serazym® Astrovirus auftretenden schwerwiegenden Vorkommnisse sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem Anwender und/oder Patient niedergelassen sind, zu melden.

Hinweise zur Testdurchführung

Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Alle Testkomponenten vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen. Reagenzien mit Anzeichen einer Kontamination sollten nicht verwendet werden.

Jede Kavität der Mikrotiterplatte kann nur einmalig benutzt werden. Jede Probe und Kontrolle muss mit einer neuen Pipettenspitze pipettiert werden. Positiv- und Negativkontrolle sind gebrauchsfertig.

Bei größeren Probenreihen empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanal-Mikropipette, um Zeitverzögerungen und Kontaminationen zu vermeiden. Die Reihenfolge der Pipettierschritte und die Dauer der Inkubationsschritte sind einzuhalten.

Die Durchführung der Absaug- und Waschschrte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Washers oder einer Wasserstrahlpumpe erfolgen. Beim Waschvorgang dispensierten, verdünnten Waschpuffer mindestens 5 s einwirken lassen und Waschpufferreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen!

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!


Sicherheitshinweise


Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.

Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potenziell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Zusätzliche Informationen über die Angaben in dieser Gebrauchsanleitung hinaus finden sich im Sicherheitsdatenblatt.

Das Produkt enthält folgende gefahrenbestimmende Substanz/en:

Testkomponente	Gefahrenkennzeichnung und ergänzende Angaben zu Inhaltsstoffen
WELLS	Enthält Material tierischen Ursprungs.
WASHBUF (10x)	EUH208: Enthält Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen. EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Konservierungsmittel: < 0,0015 % Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1); < 0,1 % 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan
DIL	Enthält Material tierischen Ursprungs. Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid
CONTROL +	Enthält Material mikrobiellen und tierischen Ursprungs. Konservierungsmittel: < 0,1 % Natriumazid
CONTROL -	Enthält Material tierischen Ursprungs. Konservierungsmittel: < 0,01 % Natriumazid
CONJ HRP	EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. Enthält Material tierischen Ursprungs. Konservierungsmittel: < 0,1 % 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan
SUBSTR	Gefahrbestimmende Komponente: 2-Pyrrolidon Signalwort: Gefahr  H319: Verursacht schwere Augenreizung. H360: Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen. P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

Testkomponente	Gefahrenkennzeichnung und ergänzende Angaben zu Inhaltsstoffen
	<p>P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.</p> <p>P308+P313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.</p> <p>Nur für gewerbliche Anwender.</p> <p>Konservierungsmittel: < 0,00015 % Gemisch aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1)</p>
STOP	<p>Gefahrbestimmende Komponente: Schwefelsäure 2,5 %</p> <p>Signalwort: Achtung</p>  <p>H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.</p>

Grenzen der Methode

Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von Astrovirus-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 ELISA schließt eine Astrovirus-Infektion nicht zwangsläufig aus. Ursachen falsch negativer Ergebnisse können einerseits durch einen ungünstigen Zeitpunkt der Probenahme und andererseits durch eine inhomogene Antigenverteilung in der Probe bedingt sein. Die Gesamtinterpretation des ELISA-Testergebnisses sollte im Zusammenhang mit dem klinischen Bild erfolgen.

Behandlung der Proben

Probennahme

Stuhl in geeignetem Probenentnahmegefäß sammeln.

Probenehaltbarkeit und -lagerung

Stuhlproben sollten sofort nach Entnahme bei 2...8 °C gelagert und innerhalb von 72 h untersucht oder eingefroren bei -20 °C gelagert werden. Wiederholtes (> 3x) Einfrieren und Auftauen der Proben ist wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate zu vermeiden. Stuhlproben, die bereits im Seramun® Sample diluent A entsprechend Gebrauchsanleitung verdünnt wurden, können bis zu 48 h bei 2...8 °C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

Probenvorbereitung

Unbehandelte Stuhlproben gut durchmischen und mit Probenpuffer 1 : 6 verdünnen.

Beispiel: In ein Reaktionsgefäß 500 µL Probenpuffer pipettieren. Bei festen oder halbfesten Stuhlproben 100 mg (etwa 2 - 3 mm Durchmesser) mit einem Einmalstäbchen, bei flüssigen Stuhlproben 100 µL in den Probenpuffer überführen und sorgfältig mischen. Gegebenenfalls Schwebeteilchen durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge 1 min bei maximaler Drehzahl sedimentieren.

Behandlung der Reagenzien

Reagenzienhaltbarkeit und -lagerung

Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzienflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zum aufgedruckten Verfalldatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 2 Monate haltbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2...8 °C bis zu 1 Monat haltbar.

Reagenzienvorbereitung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminiumbeschichteten 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. Waschpuffer (10x) 1 : 10 mit deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 mL Waschpuffer (10x) + 90 mL deionisiertes Wasser.

Testdurchführung

1. Testreagenzien und benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. 2 Tropfen (oder 75 µL) **CONJ HRP** HRP-Konjugat pro Kavität pipettieren.
3. Je 75 µL **CONTROL +** Positivkontrolle
75 µL **CONTROL -** Negativkontrolle
50 µL verdünnte Stuhlprobe hinzugeben und kurz schütteln.
4. Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
5. Dekantieren und 5-mal mit 300 µL verdünntem Waschpuffer waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
6. 2 Tropfen (oder 75 µL) **SUBSTR** Substrat pro Kavität hinzugeben.
7. 10 min **lichtgeschützt** bei RT inkubieren.
8. 2 Tropfen (oder 75 µL) **STOP** Stopplösung pro Kavität hinzugeben, kurz schütteln.
9. Messen der OD bei 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min.

Auswertung der Ergebnisse

Qualitative Auswertung

Cut-off Bestimmung: OD Negativkontrolle + 0,10

Proben mit OD-Werten gleich dem oder oberhalb des errechneten Grenzwertes sind als positiv, Proben mit OD-Werten unterhalb des errechneten Grenzwertes sind als negativ für Astrovirus-spezifische Antigene zu bewerten.

Der Test kann ausgewertet werden, wenn

- OD-Mittelwert der Negativkontrolle $\leq 0,15$ (manuelle Abarbeitung)
 $\leq 0,30$ (automatische Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der Positivkontrolle $\geq 1,00$

erreicht.

Sind die genannten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Die Abarbeitung muss gemäß Gebrauchsanleitung erfolgen (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, ist der Hersteller zu kontaktieren.

Interpretation der Ergebnisse

Positiv	\geq Cut-off
Negativ	$<$ Cut-off

Aufgrund von Unterschieden in der Patientenzusammensetzung wird empfohlen, dass jedes Labor eigene Referenzbereiche bestimmen sollte.

Leistungsmerkmale

Präzision

Zur Bestimmung der Präzision wurden 4 Proben mehrfach bestimmt. Für die Bestimmung des Intra-Assay-Variationskoeffizienten (VK) wurden die Proben in einer 8-fachen Bestimmung in einem Testlauf vermessen. Die Bestimmung des Inter-Assay-Variationskoeffizienten erfolgte ebenfalls durch eine 8-fache Bestimmung in 6 verschiedenen Testläufen.

Probe	Intra-Assay-Variationskoeffizient		Inter-Assay-Variationskoeffizient	
	\bar{x} OD	VK (%)	\bar{x} OD	VK (%)
1	1,667	8,9	1,853	3,8
2	0,994	6,4	1,019	5,8
3	0,443	6,1	0,583	11,9
4	0,185	9,8	0,350	9,7

Nachweisgrenzen

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

Sensitivität und Spezifität

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

n = 98	ELISA positiv	ELISA negativ
Serazym® ELISA positiv	49	0
Serazym® ELISA negativ	2	47

Sensitivität: 96,1 %

Spezifität: 100 %

Kreuzreaktivität

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

Adenovirus, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridioides difficile*, *Giardia lamblia*, Norovirus, Rotavirus, *Salmonella enteritidis*.

Negative Stuhlsuspensionen wurden mit folgenden Mikroorganismen mit einer Keimzahl von $\geq 10^8$ Kolonie-bildenden Einheiten pro mL in Probenpuffer getestet und im Serazym® Astrovirus als negativ bewertet (450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 13883)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	(ATCC 27337)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)	<i>Proteus vulgaris</i>	(ATCC 8427)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 10145)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)	<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>enteritidis</i>	(ATCC 13076)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)	<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i>	(ATCC 14028)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)	<i>Shigella flexneri</i>	(ATCC 12022)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)	<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)
<i>Clostridium sordellii</i>	(ATCC 9714)	<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(ATCC 13048)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(ACC 13047)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(ATCC 17802)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(ATCC 29212)	<i>Vibrio cholerae</i>	Klinisches Isolat
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)	<i>Yersinia enterocolitica</i> Serotyp O3, O9	Klinische Isolate

Interferenz

Die nachfolgend aufgelisteten Substanzen zeigten bei Zumischung zu positiven und negativen Stuhlproben in den angegebenen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis: Bariumsulfat (5 %), Buscopan® (2 mg/mL), Cyclamat (5 %), Diclofenac (2 mg/mL), Hämoglobin human (5 mg/mL), 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), Simage® (2 mg/mL), Stearinsäure (20 %), Vancomycin (2 mg/mL).

*Hylak® N kann bei Zumischung von 5 % (v/v) zu Astrovirus positiven Stuhlsuspensionen zu einer Verringerung der OD-Werte führen.

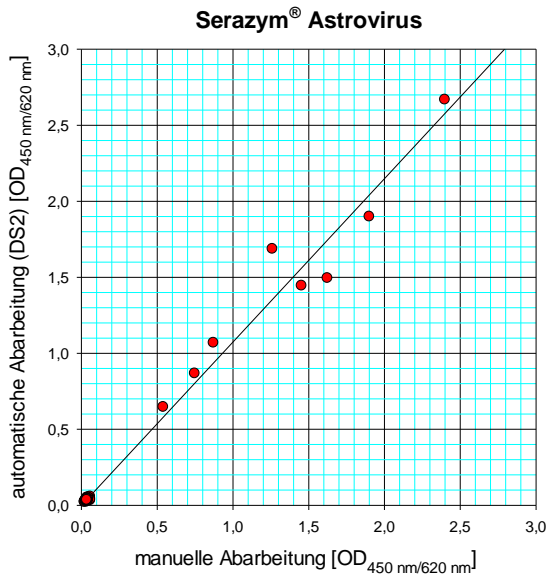
Applikation

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des Serazym[®] Astrovirus auf einem Mikrotitrationsplatten-Vollautomaten (z.B. DS2[®], DSX[®]; Dynex Technologies) 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 maximal zulässigen Grenzwertes der Negativkontrolle auf OD = 0,3 zulässig. Für den Waschprozess ist die Programmierung von Waschpuffer-Einwirkzeiten (mindestens 10 s pro Streifen und Waschschrift) gefolgt von einem Waschschrift mit deionisiertem Wasser und 10 s Einwirkzeit zu empfehlen. Gegebenenfalls kann die Anzahl der Waschschrift auf 7x bis 8x erhöht werden.

Korrelation: manuelle – automatische Abarbeitung

Im Rahmen der Untersuchung von 96 Stuhlproben wurde bei parallel durchgeführter manueller und automatischer Abarbeitung (DS2[®], Dynex Technologies) ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,993$ ermittelt.






Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2022-08_v01	Gesamtes Dokument	Aktualisierung der Zweckbestimmung Umstellung der Teilabschnitte Einfügen von Sicherheitshinweisen Anpassung der Probenverdünnung Wegfall Pipettierschema
2023-09_v02	Gesamtes Dokument	Aktualisierung Wichtige Informationen; Sicherheitshinweise Redaktionelle Änderungen

















Serazym[®] Astrovirus

Enzyme immunoassay for the qualitative detection of the capsid polyprotein of human-pathogenic astroviruses in stool samples of human origin

REF	E-045		96
REF	E-045-A2		2x96
IVD	In-vitro-diagnostic medical device		CE



Seramun Diagnostica GmbH • Sprenhagener Str. 1 • 15754 Heidesee • Germany •
 T +49 33767 791-10 • info@seramun.com • www.seramun.com

 In-vitro diagnostic medical device	 Unique device identifier	 Manufacturer
 Country of manufacture and date of manufacture	 Article number	 Serial number
 Keep away from sunlight	 Humidity limitation	 Batch code
 Consult instructions for use	 Temperature limit	 Do not reuse
 Sufficient for <i>n</i> tests	 Biohazard	 Use-by date
		 Attention

Intended Use

Serazym® Astrovirus is an IVD test for the qualitative determination of the capsid polyprotein of human-pathogenic astroviruses in stool samples of human origin by a laboratory professional user.

It is intended to aid in the diagnosis of astrovirus-associated gastroenteritis in samples of patients with symptoms of a gastroenteritis.

The test must not be used with specimen materials such as biopsy specimens, culture suspensions and materials other than stool samples of human origin, for diagnosis, monitoring, prognosis, prediction, screening, as companion diagnostic, in the near-patient setting and by lay persons.

Principle of the Test

Serazym® Astrovirus is an enzyme immunoassay based on polyclonal and monoclonal antibodies against astrovirus-specific antigens. Diluted, untreated stool samples as well as negative and positive control are dispensed simultaneously with peroxidase (HRP)-labeled monoclonal anti-astrovirus antibodies, into the wells of the microtiter plate coated with polyclonal anti-astrovirus antibodies. After incubation, unbound components are removed by a washing step, then HRP converts the colorless substrate solution to a blue reaction product in the following enzymatic reaction step. After incubation the reaction is stopped by addition of the stop solution, resulting in a color change from blue to yellow. The optical density (OD) of the reaction product measured at 450 nm measurement and ≥ 620 nm reference filter, respectively, is directly proportional to the concentration of specifically bound astrovirus antigens.

Test Components (Delivery Scope)

			For 96 wells	For 2x 96 wells
1	WELLS	Microtiter plate coated with polyclonal anti-astrovirus antibodies (sheep)	12 single breakable 8-well strips, light blue color marking, vacuum- sealed with desiccant	2x 12 single breakable 8-well strips, light blue color marking, vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF (10x)	Wash buffer (10x) Seramun® Wash buffer A TRIS-based buffer	100 mL concentrate for 1000 mL solution, colorless, white cap	2x 100 mL concentrate for 2 x 1000 mL solution, colorless, white cap
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent A Phosphate-based buffer	100 mL, ready to use, colored yellow black cap	2x 100 mL, ready to use, colored yellow black cap
4	CONTROL +	Positive control Astrovirus positive sample	1.5 mL, ready to use, colored blue, red cap	3.0 mL, ready to use, colored blue, red cap
5	CONTROL -	Negative control TRIS-based buffer	1.5 mL, ready to use, colored blue, green cap	3.0 mL, ready to use, colored blue, green cap
6	CONJ HRP	HRP conjugate HRP-labeled, monoclonal anti-astrovirus antibodies (mouse)	12 mL, ready to use, colored green, brown cap	24 mL, ready to use, colored green, brown cap

7	SUBSTR	Substrate SeramunBlau® automat fast < 0.1 % 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine; < 0.05 % hydrogen peroxide	15 mL, ready to use, colorless, blue cap	28 mL, ready to use, colorless, blue cap
8	STOP	Stop solution SeramunBlau® stop 0.25 M sulphuric acid	15 mL, ready to use, colorless, yellow cap	28 mL, ready to use, colorless, yellow cap
9	COVER	Covering film	1 piece	-
10		Certificate of Analysis	1 piece	1 piece
11		Instructions for Use	1 piece	1 piece

Additional Materials and Aids Required for the Test Procedure

Adjustable single-channel micropipette • 8-channel micropipette or multichannel micropipette with pipette tips • 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer • microplate reader with 450 nm measuring filter and ≥ 620 nm reference filter • deionized water • measuring cylinder • tubes for sample preparation

Important Information



This device is for *in-vitro* diagnostic use only. Follow the instructions carefully. The kit may be performed by health professionals only.

Do not use reagents from damaged packages or bottles. The shelf life specified must be observed. Do not mix components with reagents from other manufacturers.

Mixing of test kit components of different lots is only allowed for wash buffer (10x), sample diluent, substrate and stop solution.

Wash buffer (10x), sample diluent, substrate and stop solution are universally applicable for Serazym® stool ELISA Adenovirus (E-017), Astrovirus (E-045), Campylobacter (E-093), Clostridium difficile GDH (E-107), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Cryptosporidium parvum (E-039), Entamoeba histolytica (E-018), Giardia (E-106), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Norovirus (E-061) and Rotavirus (E-020).

All serious incidents occurring in relation with Serazym® Astrovirus must be reported to the manufacturer and the competent authority of the EU member state in which user and/or patient are located.

Information on Assay Procedure

All reagents should be stored at 2...8 °C. Bring all test components to room temperature before use. Reagents that appear contaminated should not be used.

Each well of a microtiter plate can only be used once. Each sample and control have to be pipetted with a new pipette tip. Positive and negative control are ready to use.

For larger sample series, pipetting reagents from liquid reservoirs using a multi-channel micropipette is recommended to avoid time delays and contaminations. Follow the pipetting scheme and time schedules of the protocol.



The aspiration and washing steps can be performed manually or with the help of a microplate washer or waterjet pump. Wash solution should be allowed a minimum reaction time of 5 s in the wells per wash cycle. Remove wash buffer residues by thoroughly aspirating or tapping out the wells!

Protect substrate from light!

Safety Instructions

Reagents must not be swallowed. Contact with skin or mucous membranes should be avoided. Handle all components and patient samples as if potentially hazardous and infectious. Additional information may be taken from the Safety Data Sheet.

Product contains the following hazardous component/-s:

Test component	Hazard labeling and supplementary information on ingredients
WELLS	Contains material of animal origin.
WASHBUF (10x)	EUH208: Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction. EUH210: Safety data sheet available on request. Preservatives: < 0.0015 % reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1); < 0.1 % 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
DIL	Contains material of animal origin. Preservatives: < 0.1 % sodium azide
CONTROL +	Contains material of microbial and animal origin. Preservatives: < 0.1 % sodium azide
CONTROL -	Contains material of animal origin. Preservatives: < 0.01 % sodium azide
CONJ HRP	EUH210: Safety data sheet available on request. Contains material of animal origin. Preservative: < 0.1 % 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
SUBSTR	Hazard component: 2-pyrrolidone Signal word: Danger  H319: Causes serious eye irritation. H360: May damage fertility or the unborn child. P201: Obtain special instructions before use. P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P308+P313: IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. Restricted to professional users. Preservatives: < 0.00015 % reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1)
STOP	Hazard component: sulphuric acid 2.5 % Signal word: Warning  H290: May be corrosive to metals.

Limitations of the Procedure

The qualitative enzyme immunological detection of astrovirus antigens in stool samples does not allow a correlation between the measured OD and the severity of an infection. Also, it is not allowed to correlate absorbances of samples with the absorbance of the positive control. Cross contamination of reagents and samples may result in false results. Incorrect dilutions, insufficiently homogenized samples, and particles not sedimented by centrifugation may cause false positive as well as false negative test results. Sample taking within the acute phase of an infection is recommended as the number of excreted particles in this phase is expected to reach its maximum. A negative test result obtained with Serazym® Astrovirus does not exclude an astrovirus infection. False negative tests may result from improper timing of sample collection or inhomogeneous antigen distribution in the sample. The overall interpretation of the ELISA test result should consider the full clinical picture.

Sample Treatment

Sample Collection

Collect stool sample in suitable sampling container.

Sample Shelf Life and Storage

Stool samples should be stored at 2...8 °C immediately after collection and examined within 72 h or stored frozen at -20 °C. Repeated (> 3x) freezing and thawing of samples should be avoided due to the risk of incorrect results. Stool samples that have already been diluted in Seramun® Sample diluent A according to the instructions for use can be stored at 2...8 °C for up to 48 h and subsequently analyzed by ELISA.

Sample Preparation

Mix untreated stool samples well and dilute 1 : 6 with sample buffer.

Example: Pipette 500 µL sample buffer into a reaction tube. For solid or semi-solid stool samples transfer 100 mg (approx. 2 – 3 mm diameter) with a disposable stick, for liquid stool samples transfer 100 µL into the sample buffer and mix thoroughly. If necessary, sediment suspended particles by centrifugation in a microcentrifuge for 1 min at maximum speed.

Reagent Treatment

Reagent Shelf Life and Storage

The complete test kit with sealed reagent bottles and microtitration strips can be stored at 2...8 °C until the printed expiration date. All opened test kit components are stable for up to 2 months when stored properly at 2...8 °C. The diluted wash buffer can be stored at 2...8 °C for up to 1 month.

Reagent Preparation

Microtiter plate with breakable 8-well strips is vacuum sealed with desiccant. Allow packaging to reach room temperature before opening. Protect unused wells from moisture and store refrigerated with desiccant in the original bag carefully resealed. Dilute wash buffer (10x) 1 : 10 with deionized water.

Example: 10 mL wash buffer (10x) + 90 mL deionized water.

Assay Procedure

1. Allow test reagents and required number of wells to reach room temperature (RT). Shake reagents gently before use. Avoid foaming.
2. Pipette 2 drops (or 75 μL) **CONJ HRP** HRP conjugate per well.
3. Add 75 μL **CONTROL +** Positive control
75 μL **CONTROL -** Negative control
50 μL diluted stool specimen each and mix gently.
4. Cover the plate and incubate for 60 min at RT.
5. Decant, then wash each well 5x with 300 μL diluted wash buffer. Tap dry onto absorbent paper if necessary.
6. Add 2 drops (or 75 μL) **SUBSTR** substrate per well.
7. Incubate for 10 min at RT **protected from light**.
8. Add 2 drops (or 75 μL) **STOP** stop solution per well, mix gently.
9. Read OD at 450 nm measuring filter and ≥ 620 nm reference filter with a microplate reader within 30 min following reaction stop.

Evaluation of Results

Qualitative Evaluation

Cut-off determination: OD negative control + 0.10

Samples showing OD values equal with or higher than the cut-off are considered positive, samples with OD values below cut-off are considered negative for astrovirus antigens.

The test run is valid if:

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

If the above-mentioned quality criteria are not met, test should be repeated strictly following the test procedure (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps, etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact the manufacturer.

Interpretation of Results

Positive	\geq cut-off
Negative	$<$ cut-off

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges.

Performance Characteristics

Precision

To determine precision, 4 stool samples were measured multiple times. For the determination of the intra-assay coefficient of variation (CV) samples were measured in an 8-fold determination in one test run.

The determination of the inter-assay coefficient of variation was done by an 8-fold determination in 6 different test runs.

Sample	Intra-assay coefficient of variation		Inter-assay coefficient of variation	
	\bar{x} OD	CV (%)	\bar{x} OD	CV (%)
1	1.667	8.9	1.853	3.8
2	0.994	6.4	1.019	5.8
3	0.443	6.1	0.583	11.9
4	0.185	9.8	0.350	9.7

Detection Limit

The lower detection limit of Serazym® Astrovirus was determined by titration of purified astrovirus antigen at 6 ng/mL.

Sensitivity and Specificity

Sensitivity and specificity of Serazym® Astrovirus have been determined in a retrospective study with 98 stool specimens in comparison to a commercially available ELISA.

n = 98	ELISA positive	ELISA negative
Serazym® ELISA positive	49	0
Serazym® ELISA negative	2	47

Sensitivity: 96.1 %

Specificity: 100 %

Cross Reactivity

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

Adenovirus, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridioides difficile*, *Giardia lamblia*, norovirus, rotavirus, *Salmonella enteritidis*.

Negative stool suspensions were spiked with the following microorganisms with a bacterial count of $\geq 10^8$ colony-forming units per mL in sample buffer and tested negative in the Serazym® Astrovirus (450 nm measurement and ≥ 620 nm reference filter < cut-off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 13883)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	(ATCC 27337)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)	<i>Proteus vulgaris</i>	(ATCC 8427)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 10145)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)	<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>enteritidis</i>	(ATCC 13076)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)	<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i>	(ATCC 14028)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)	<i>Shigella flexneri</i>	(ATCC 12022)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)	<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)
<i>Clostridium sordellii</i>	(ATCC 9714)	<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(ATCC 13048)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(ATCC 13047)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(ATCC 17802)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(ATCC 29212)	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical isolate
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)	<i>Yersinia enterocolitica</i> Serotyp O3, O9	Clinical isolate

Interference

None of the following substances in the indicated concentrations added to astrovirus positive and negative stool samples did show a significant impact on the test result:

Barium sulfate (5 %), Buscopan® (2 mg/mL), Cyclamate (5 %), Diclofenac (2 mg/mL), human haemoglobin (5 mg/mL), 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), Simagei® (2 mg/mL), stearic acid (20 %), Vancomycin (2 mg/mL).

*The addition of 5 % (v/v) Hylak® N to astrovirus positive stool suspensions may decrease OD values.

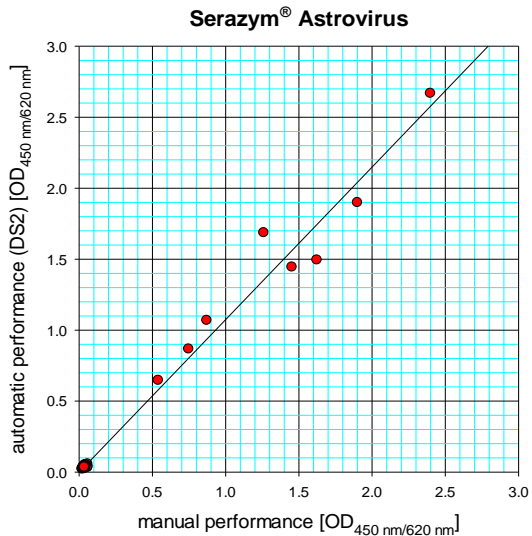
Application

Automatic Processing

Performing Serazym® Astrovirus on fully automated microplate processors (e.g., DS2®, DSX®; Dynex Technologies) may cause elevated absorbance values in comparison to the manual procedure caused by differences in the wash procedures and technical specifications of the equipment. In these cases, a maximum value of OD = 0.3 is permissible for the negative control. It is recommended to program a wash protocol with 10 s soak time per strip and wash step. A final wash step with deionized water and a soak time of 10 s is recommended after each wash cycle. If necessary, the number of wash steps may be increased to 7x or 8x.

Correlation: manual – automatic processing

A panel of 96 stool specimens was processed manually and automatically in parallel (DS2®, Dynex Technologies). The correlation coefficient was calculated at $r = 0.993$.



Change History

Version	Section	Modifications
2022-08_v01	Entire document	Updating of Intended Use Conversion of subsections Insertion of Safety Instructions Updating of sample dilution Removal of Pipetting Scheme
2023-09_v02	Entire document	Update of Important Information; Safety Instructions Editorial changes

References

1. Cukor, G and Blacklow, NR (1984): "Human Viral Gastroenteritis". *Microbiological Reviews* 48(2): 157-179.
2. Gaggero, A, O’Ryan, M et al. (1998): "Prevalence of Astrovirus Infection among Chilean Children with Acute Gastroenteritis". *Journal of Clinical Microbiology* 36(12): 3691-3693.
3. Koukou, G, Niendorf, S, Hornei, B et al (2019): "Human astrovirus infection associated with encephalitis in an immunocompetent child: a case report". *J Med Case Reports* 13(341). <https://doi.org/10.1186/s13256-019-2302-6>
4. Palombo, EA and Bishop, RF (1996): "Annual Incidence, Serotype Distribution and Genetic Diversity of Human Astrovirus Isolates from Hospitalized Children in Melbourne, Australia". *Journal of Clinical Microbiology* 34(7): 1750-1753.
5. Rohwedder, A (2000): "Virale Gastroenteritiden, Erreger und Diagnostik". *Mikrobiologie* 10: 121-126.