

RIDASCREEN® Norovirus

3rdGeneration

Codice prodotto: C1401



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany
Telefono: +49 (0) 61 51 - 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20



1. Campo di applicazione

Per uso diagnostico *in vitro*. Il test RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation è un test immunoenzimatico per la rilevazione qualitativa di norovirus del genogruppo I e II in campioni di feci umane.

2. Sintesi e spiegazione del test

I *norovirus* costituiscono una causa significativa di gastroenterite in tutto il mondo, con 23 milioni di casi stimati all'anno negli USA (1, 2). Sono spesso coinvolti negli episodi di infezione in istituti e comunità come case di cura, ospedali, asili di infanzia e carceri oppure su navi da crociera (3, 4, 5). Benché le manifestazioni dell'infezione da norovirus possano costituire un onere considerevole per la salute pubblica, vengono spesso riferiti come manifestazioni di infezioni batteriche (6).

La gastroenterite causata da un norovirus è caratterizzata da forte nausea e vomito violento associati a grave diarrea. Il tempo di incubazione è compreso tra 6 e 48 ore e i sintomi possono persistere per ulteriori 12 - 60 ore. La dose infettiva è estremamente bassa e solo 100 particelle di virus sono sufficienti per una diffusione molto efficace da individuo a individuo. Dato che il virus viene espulso sia con le feci sia con il vomito, oltre alla trasmissione fecale-orale, assume importanza anche la trasmissione aerogena attraverso la formazione di aerosol contenenti il virus. Ciò si manifesta attraverso la diffusione, spesso molto rapida, nei luoghi di frequentazione comune. Salvo rare eccezioni, la manifestazione del virus persiste per circa 2 settimane nascondendo il pericolo di ulteriore diffusione. Sono possibili infezioni ricidive, in quanto, non da ultimo, la notevole variabilità dei norovirus non consente un'immunità completa.

I metodi diagnostici usuali di analisi dei campioni di feci sono limitati all'elettromicroscopia o principalmente alla rilevazione molecolare del genoma mediante PCR. Dato che questi metodi sono relativamente dispendiosi e richiedono una particolare esperienza e dotazione tecnica di laboratorio, è necessario un test di screening più semplice e rapido. Questo test ELISA, attualmente già perfezionato nella terza generazione, risponde ampiamente a tale requisito. Il RIDASCREEN® Norovirus ELISA con anticorpi monoclonali consente una rilevazione molto specifica e ad alta sensibilità dei norovirus di entrambi i genogruppi.

3. Principio del test

Nel test RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation Test gli anticorpi monoclonali specifici sono posizionati a sandwich. La superficie dei pozzetti della micropiastra viene rivestita con anticorpi specifici agli antigeni di diversi genotipi.

Una sospensione del campione di feci da esaminare e i controlli vengono introdotti nel pozzetto della piastra per microtitolazione insieme ad anticorpi anti-norovirus monoclonali biotinilati (Coniugato 1) mediante pipetta a temperatura ambiente (20 e 25 °C) per l'incuba-

zione. Dopo il lavaggio aggiungere il poli-coniugato streptavidina-perossidasi (Coniugato 2) e incubare nuovamente a temperatura ambiente (20 e 25 °C). Alla presenza di norovirus nel campione di feci si forma un complesso a sandwich composto dagli anticorpi immobilizzati, gli antigeni norovirus e gli anticorpi coniugati con il complesso biotina-streptavidina-perossidasi. Un altro lavaggio rimuove il poli-coniugato streptavidina-perossidasi non legato. Nei campioni positivi, l'aggiunta di un substrato trasforma l'enzima legato da una soluzione incolore in una soluzione blu. L'aggiunta di un reagente bloccante causa una variazione cromatica da blu a giallo. L'estinzione è proporzionale alla concentrazione di norovirus presenti nel campione.

4. Reagenti forniti

I reagenti nel kit sono sufficienti per 96 determinazioni.

| | | |
|---------------|--------|--|
| Plate | 96 | Piastra per microtitolazione, 12 strisce di micropozzetti (separabili) in telaio di fissaggio; rivestimento con anticorpi monoclonali specifici anti-norovirus |
| Diluent 1 | 100 ml | Tampone di diluizione del campione, soluzione salina proteica tamponata, pronta per l'uso, colorazione blu |
| Wash | 100 ml | Tampone di lavaggio, soluzione salina tamponata al fosfato (concentrata 10 volte); contiene 0.1% di Thimerosal |
| Control + | 2 ml | Controllo positivo (proteina del capsido <i>Norovirus</i> inattivata); pronto all'uso |
| Control - | 2 ml | Controllo negativo (tampone di diluizione dei campioni); pronto per l'uso |
| Conjugate 1 | 13 ml | Anticorpi anti-norovirus coniugati in biotina in soluzione proteica stabilizzata; pronto per l'uso; colorazione in blu |
| Conjugate 2 | 13 ml | Poli-coniugato streptavidina-perossidasi in soluzione proteica tamponata; pronto per l'uso; colorato in arancione |
| Substrate | 13 ml | Perossido di idrogeno/TMB; pronto per l'uso |
| Stop | 12 ml | Reagente di bloccaggio; acido solforico 1 N; pronto per l'uso |

5. Reagenti e loro conservazione

Tutti i reagenti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C e possono essere utilizzati fino alla data stampata sull'etichetta. Il tampone di lavaggio diluito è utilizzabile per quattro settimane se conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Evitare la

contaminazione microbica. Dopo la data di scadenza, non può essere più fornita alcuna garanzia di qualità.

La busta in alluminio deve essere aperta con le forbici, in modo tale da non rimuovere la chiusura a clip. Le strisce per microtitolazione inutilizzate devono essere immediatamente riposte nella busta in alluminio e conservate a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.

Evitare l'esposizione diretta alla luce del substrato incolore, per evitare la decomposizione o la colorazione blu per auto-ossidazione. Un substrato che sia diventato blu non deve essere utilizzato.

6. Reagenti aggiuntivi necessari – attrezzatura richiesta

6.1. Reagenti forniti

- Acqua distillata o deionizzata

6.2. Attrezzatura

- Provette
- Pipette monouso (Codice articolo: Z0001)
- Vorticolatore (opzionale, vedere Punto 9.3.)
- Micropipetta da 50 – 100 µl e 1 ml in volume
- Cilindro graduato (1.000 ml)
- Cronometro
- Dispositivo di lavaggio per piastre per microtitolazione o pipette multicanale (300 µl)
- Fotometro per piastre per microtitolazione (450 nm e filtro di riferimento 620 - 650 nm)
- Carta filtrante (carta da laboratorio)
- Contenitore di rifiuti con soluzione di ipoclorito allo 0,5 %

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso nell'esecuzione del test.

Non introdurre con la bocca campioni o reagenti mediante pipetta, evitare il contatto con la cute lesa o con le mucose. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e lavare le mani dopo aver eseguito il test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

Per maggiori informazioni consultare la Scheda di sicurezza dei materiali (MSDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

Il controllo positivo nel kit contiene proteina del capsido norovirus inattivata. Deve essere trattato come potenzialmente infettivo, analogamente al campione del paziente, e maneggiato in conformità alle disposizioni di sicurezza nazionali vigenti.

Il tampone di lavaggio contiene 0,1 % di Thimerosal come conservante. Questa sostanza non deve entrare in contatto con la cute o le membrane mucose.

Garantire uno smaltimento idoneo e responsabile di tutti i reagenti e i materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

I campioni di feci devono essere raccolti il più presto possibile entro tre giorni dalla comparsa dei sintomi iniziali di diarrea. Fino all'uso, conservare il materiale di test a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Qualora il materiale non possa essere utilizzato per un test entro tre giorni, si raccomanda di conservarlo a una temperatura di -20 °C o inferiore. Evitare il ripetuto congelamento e scongelamento del campione. Dopo la diluizione in tampone 1:11, il campione può essere conservato a 4 °C e dovrà essere utilizzato entro sette giorni.

I campioni di feci e i prelievi rettali non devono essere riposti in contenitori per il trasporto contenenti sostanze per il trasporto come conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti e detergenti, in quanto potrebbero crearsi interferenze con il test RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation Test.

Se vengono usati prelievi rettali, assicurarsi che il volume del materiale fecale sia sufficiente (circa 100 mg) per il test.

Le indagini ambientali devono includere anche campioni di feci prelevati da persone che non mostrano sintomi clinici al fine di identificare i portatori asintomatici.

9. Esecuzione del test

9.1 Informazioni generali

Tutti i reagenti e la Plate piastra di microtitolazione devono essere portati a temperatura ambiente (20 e 25 °C) prima

busta in alluminio solo dopo il raggiungimento della temperatura ambiente. Mescolare con cura i reagenti immediatamente prima dell'utilizzo. Dopo l'uso, le strisce di micropozzetti (inserite in buste sigillate) e i reagenti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Una

le strisce per microtitolazione non devono essere utilizzati se l'imballaggio è danneggiato o i flaconi non sono ermetici.

Evitare il contatto diretto dei campioni con i componenti del kit per evitare la contaminazione incrociata.

Il test non deve essere esposto all'irradiazione solare diretta. Si raccomanda di coprire la piastra per microtitolazione o di sigillarla con una pellicola in plastica per evitare la perdita per evaporazione.

9.2. Preparazione del tampone di lavaggio

Miscelare 1 parte di concentrato di tampone di lavaggio **Wash** con 9 parti di acqua distillata. Eventuali cristalli presenti nel concentrato devono essere precedentemente riscaldati in un bagnomaria a 37 °C per scioglierli.

9.3 Preparazione dei campioni

Introdurre in una provetta marcata 1 ml di tampone per diluizione dei campioni RIDASCREEN® **Diluent | 1**. Utilizzare una pipetta monouso (codice prodotto Z0001) per aspirare un campione di feci liquide (circa 100 µl) fino a superare di poco la seconda graduazione e aggiungerlo al tampone nella provetta per ottenere una sospensione. Per realizzare una sospensione con un campione di feci solide, introdurre una quantità equivalente (circa 50 - 100 mg) con una spatola o un'ansa di inoculazione monouso.

Omogeneizzare la sospensione fecale mediante aspirazione ed espulsione tramite pipetta monouso oppure, in alternativa, miscelare in un vortiatore. Lasciare riposare la sospensione per un breve periodo (10 minuti) affinché le particelle di feci più grandi possano depositarsi, quindi il supernatante di sospensioni di feci purificato è pronto per essere utilizzato direttamente nel test. Se la procedura viene eseguita in un sistema ELISA automatico, il supernatante **non** deve contenere particelle. In questo caso, è consigliabile centrifugare il campione a 2.500 G per 5 minuti.

Nota:

I campioni di feci diluiti in **Diluent | 1** possono essere testati in tutti i dosaggi RIDASCREEN® ELISA per cui viene usato il diluente **Diluent | 1**.

9.4. Prima incubazione

Dopo aver inserito un numero sufficiente di pozzetti nel telaio di fissaggio, introdurre 100 µl di controllo positivo **Control | +**, controllo negativo **Control | -** o sospensione di feci. Quindi aggiungere 100 µl dell'anticorpo biotina-coniugato **Conjugate | 1** e miscelare (dando dei leggeri colpi sul bordo della piastra); successivamente incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (20 e 25 °C).

9.5. Lavaggio

Un accurato lavaggio è importante per ottenere i giusti risultati e deve pertanto essere effettuato in stretta conformità con le istruzioni. Il prodotto di incubazione dei pozzetti deve essere svuotato in un contenitore per rifiuti per poi essere smaltito nel rispetto delle disposizioni locali. Quindi, tamponare la piastra su carta assorbente per rimuovere l'umidità

residua. Lavare la piastra cinque volte utilizzando 300 µl di lampone di lavaggio ogni volta. Assicurarsi che i pozzetti vengano completamente svuotati estroflettendoli tamponandoli dopo ciascun lavaggio su un'area di carta assorbente ancora asciutta e inutilizzata.

Se si utilizza una lavatrice per micropiastre o un sistema ELISA completamente automatico, assicurarsi che la macchina sia correttamente regolata e, se necessario, chiedere le impostazioni al produttore. I dispositivi forniti da R-Biopharm sono già programmati con le impostazioni e i protocolli di lavoro convalidati. Per evitare di bloccare gli aghi di lavaggio, introdurre solo sospensioni di feci prive di particelle (vedere Punto 9.3., Preparazione dei campioni). Inoltre, assicurarsi che tutto il liquido venga aspirato in ogni fase di lavaggio.

9.6. Seconda incubazione

Utilizzare una pipetta per introdurre 100 µl di poli-coniugato streptavidina-perossidasi **Conjugate 2** nei campioni, quindi incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.7. Lavaggio

Lavare come descritto al Punto 9.5.

9.8. Terza incubazione

Iniettare nei pozzetti 100 µl di substrato **Substrate**. Quindi incubare la piastra per 15 minuti al buio a temperatura ambiente (20 e 25°C). Successivamente inserire in tutti i pozzetti 50 µl di reagente bloccante **Stop** per arrestare la reazione. Dopo aver accuratamente miscelato picchiettando leggermente sul lato della piastra, misurare l'estinzione a 450 nm (opzionale: 450/620 nm). Regolare il punto zero contro aria, ovvero senza la piastra per microtitolazione.

Nota:

I campioni di pazienti altamente positivi possono causare precipitati nerastri del substrato.

10. Controllo della qualità – indicazioni della scadenza dei reagenti

Per il controllo della qualità eseguire il controllo positivo e negativo ad ogni esecuzione del test al fine di garantire la stabilità dei reagenti e la corretta esecuzione del test. Il test è eseguito correttamente se il tasso di estinzione (O.D.) del controllo negativo è inferiore a 0,2 a 450 nm (inferiore a 0,160 a 450/620 nm) e il valore misurazione del controllo positivo è superiore a 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valore superiore a 0,2 (0,160) per il controllo negativo può indicare un lavaggio insufficiente. La deviazione dai valori richiesti, proprio come un'opacizzazione o una colorazione blu del substrato incolore prima dell'inserimento nei pozzetti, può indicare che i reagenti sono scaduti.

Se i valori stipulati non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata (p.es. calibrazione)
- Procedura di esecuzione del test corretta
- Controllare visivamente che i componenti del kit non presentino contaminazione o perdite: non utilizzare una soluzione di substrato che sia diventata blu.

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo la ripetizione del test, rivolgersi al produttore o al proprio distributore R-Biopharm locale.

11. Valutazione e interpretazione

11.1. Calcolo del valore limite

Per stabilire il valore limite, introdurre 0,15 unità di estinzione all'estinzione misurata per il controllo negativo.

$$\text{Valore limite} = \text{estinzione per il controllo negativo} + 0,15$$

11.2. Risultati del test

Il campione è considerato **positivo** se il tasso di estinzione supera il valore limite calcolato di più del 10 %.

Il campione viene considerato **marginale** se il tasso di estinzione è compreso tra 10 % in meno e 10 % in più rispetto al valore limite. Se l'esame ripetuto con un campione di feci fresco rientra ancora nella zona grigia, il campione viene considerato negativo.

I campioni con estinzioni superiori al 10 % al di sotto del limite calcolato devono essere considerati **negativi**.

12. Limiti del metodo

The RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation Test identifica gli antigeni del norovirus nei campioni di feci e rileva entrambi i genogruppi (I e II) che causano malattia nell'uomo. Sebbene non siano stati testati tutti i genotipi e i relativi sottotipi, possono essere rilevati quasi tutti i genotipi fino a oggi noti nelle affezioni gastroenteriche a condizione che la carica virale nel campione non sia inferiore al limite di rilevazione del test ELISA al momento del prelievo. Non è possibile stabilire una relazione tra il livello di estinzione rilevato e l'insorgenza o la gravità della sintomatologia clinica. **I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati nel contesto del quadro clinico.** È possibile che soggetti asintomatici espellano il virus e questi possono essere individuati con questo test ELISA (indagine ambientale). La carica virale disponibile è sempre decisiva.

Un risultato **positivo** non esclude la presenza di altri patogeni infettivi. La letteratura descrive in maniera sufficiente infezioni doppie e multiple provocate da potenziali agenti patogeni della gastroenterite e queste possono essere rilevate grazie alla diagnosi differenziale. In molti casi, spesso la sintomatologia clinica è notevolmente più evidente rispetto alle patologie monocausali.

Un risultato **negativo** non esclude la possibilità di infezione da norovirus. Tale risultato può essere causato dall'epulsione intermittente del virus, dalla raccolta del campione nel momento sbagliato (si veda il punto 8 "Raccolta e conservazione dei campioni"), da una carica virale troppo bassa o dal maneggiamento inappropriato del campione. Qualora a livello anamnestico sussista il sospetto di infezione da norovirus, l'esame deve essere ripetuto con un altro campione di feci.

Un risultato **borderline** può derivare dalla distribuzione non omogenea del virus nel campione di feci, da una carica virale borderline per il test ELISA all'inizio, da un lavaggio insufficiente dei pozzetti per microtitolazione oppure può indicare un'infezione in regressione. In questo caso, l'esame deve essere ripetuto con una seconda sospensione dallo stesso campione o in alternativa dovrà essere richiesto un altro campione di feci.

Al momento il test RIDASCREEN® Norovirus ELISA is è convalidato per l'esame dei campioni di meconio, pertanto i risultati di questi dosaggi devono essere interpretati con cautela. Una varietà di prodotti per la cura dei lattanti quali creme, oli e unguenti che potrebbero passare dal pannolino al campione di feci durante il prelievo sono stati utilizzati per intensificare i campioni di feci negativi al norovirus e non è stata osservata alcuna influenza sul risultato delle analisi. Analogamente, campioni di feci positivi per norovirus non hanno subito un'influenza negativa a causa della presenza dei prodotti di marca testati.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1. Qualità del test

In uno studio di validazione condotto con RIDASCREEN® Norovirus ELISA 3rdGeneration sono stati impiegati 60 campioni che sono stati esaminati con metodo RT-PCR nell'ambito di una diagnosi di routine condotta durante la stagione invernale 2004/2005 presso l'Istituto di Virologia dell'Università di Dresda e gli stessi sono stati successivamente congelati (-20 °C) e conservati. Altri 123 campioni prelevati dalla stagione invernale 2006 (da gennaio a maggio) sono stati identificati mediante RT-PCR, congelati e conservati in vista di un impiego successivo. I risultati di entrambi i panel sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1: Confronto tra RIDASCREEN® Norovirus ELISA 3rdGeneration e RT-PCR

| | | RIDASCREEN® Panel inverno 2004/5 | | RIDASCREEN® Panel inverno 2006 | |
|--------|---|-------------------------------------|----|-----------------------------------|----|
| | | + | - | + | - |
| RT-PCR | + | 28 | 2 | 55 | 15 |
| | - | 0 | 30 | 0 | 53 |

| | | |
|-----------------------------------|---------|---------|
| Sensibilità: | 93,3 % | 78,6 % |
| Specificità | 100,0 % | 100,0 % |
| Valore predittivo positivo (PPV): | 100,0 % | 100,0 % |
| Valore predittivo negativo (PPV): | 93,8 % | 77,9 % |
| Accuratezza: | 96,7 % | 87,8 % |

13.2. Reattività incrociata

Diversi microrganismi patogeni del tratto intestinale sono stati esaminati con il test RIDASCREEN® Norovirus ELISA. Questi studi sono stati condotti con batteri non diluiti o sospensioni di virus con concentrazioni di organismi per ml comprese tra 10^6 e 10^9 . I risultati di questo studio sono riepilogati nella Tabella 2.

Tabella 2: Reattività incrociata con microrganismi patogeni

| Organismo | Origine | [OD 450/620] |
|--------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| Adenovirus | Supernatante di coltura cellulare | 0,010 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | Coltura | 0,007 |
| <i>Bacillus cereus</i> | Coltura | 0,007 |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | Coltura | 0,025 |
| <i>Campylobacter coli</i> | Coltura | 0,002 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | Coltura | 0,005 |
| <i>Candida albicans</i> | Coltura | 0,004 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | Coltura | 0,002 |
| <i>Clostridium difficile</i> | Coltura | 0,002 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | Coltura | 0,002 |
| <i>Clostridium sordellii</i> | Coltura | 0,003 |
| <i>E. coli</i> (O26:H-) | Coltura | 0,004 |
| <i>E. coli</i> (O6) | Coltura | 0,003 |

| | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------|
| <i>E. coli</i> (O157:H7) | Coltura | 0,000 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Coltura | 0,002 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Coltura | 0,007 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | Coltura | 0,008 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | Coltura | 0,008 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Coltura | 0,009 |
| Rotavirus | Supernatante di coltura cellulare | 0,010 |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | Coltura | 0,007 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | Coltura | 0,007 |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | Coltura | 0,005 |
| <i>Shigella flexneri</i> | Coltura | 0,007 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Coltura | 0,007 |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Coltura | 0,009 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | Coltura | 0,008 |

13.3. Precisione:

La riproducibilità del test RIDASCREEN® Norovirus ELISA è stata verificata su sei riferimenti che rappresentano l'intero range di misurazione da debolmente ad altamente positivo. Per la determinazione della riproducibilità intra-analisi, sono stati esaminati 40 replicati di questi riferimenti. Sono stati determinati i valori medi e il coefficiente di variazione (CV) per tre lotti dei kit. Per la riproducibilità inter-analisi, le misurazioni dei riferimenti sono state eseguite in 10 giorni lavorativi diversi con 2 serie al giorno con test doppi. Le misurazioni sono state eseguite con tre lotti di kit da parte di tre tecnici. La riproducibilità inter-lotto è stata determinata per tutti e tre i lotti di kit. Come atteso, il risultati del Riferimento 6 results erano negativi in tutte le analisi. I risultati di questo studio sono presentati nella Tabella 3.

Tabella 3: Precisione del test RIDASCREEN® Norovirus ELISA

| Riferimento | Valore medio / CV | Intra-analisi | | | Inter-analisi | | | Inter-lotto |
|-------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| | | Lotto del kit 1 | Lotto del kit 2 | Lotto del kit 3 | Lotto del kit 1 | Lotto del kit 2 | Lotto del kit 3 | Lotto del kit 1-3 |
| 1 | MV [OD 450/620] | 2,295 | 2,254 | 2,141 | 2,090 | 2,148 | 2,109 | 2,116 |
| | VC (%) | 5,86% | 5,00% | 5,75% | 13,08% | 10,23% | 13,40% | 4,79% |

| | | | | | | | | |
|---|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 2 | MV [OD 450/620] | 1,524 | 1,617 | 1,482 | 1,499 | 1,574 | 1,414 | 1,496 |
| | VC (%) | 5,79% | 5,48% | 4,43% | 13,23% | 16,24% | 18,10% | 7,58% |
| 3 | MV [OD 450/620] | 1,126 | 1,193 | 0,738 | 1,168 | 1,199 | 1,189 | 1,185 |
| | VC (%) | 6,19% | 6,46% | 7,06% | 11,77% | 13,61% | 20,32% | 6,60% |
| 4 | MV [OD 450/620] | 0,578 | 0,655 | 0,577 | 0,649 | 0,666 | 0,586 | 0,634 |
| | VC (%) | 8,46% | 5,46% | 10,09% | 16,22% | 13,16% | 19,87% | 4,80% |
| 5 | MV [OD 450/620] | 0,315 | 0,387 | 0,335 | 0,318 | 0,325 | 0,301 | 0,315 |
| | VC (%) | 5,80% | 7,64% | 8,02% | 18,82% | 17,17% | 24,12% | 7,39% |
| 6 | MV [OD 450/620] | 0,009 | 0,022 | 0,036 | 0,019 | 0,017 | 0,011 | 0,016 |
| | VC (%) | non dispo- nibile |

13.4. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del test RIDASCREEN® Norovirus ELISA è stata determinata per due campioni di feci nativi (uno per ciascuno dei genogruppi I e II), dove i campioni erano stati precedentemente testati per le concentrazioni di norovirus mediante elettromicroscopia (EM) nonché RT-PCR in tempo reale. Per ottenere una concentrazione virale idonea per le analisi EM e PCR, entrambi i campioni sono stati inizialmente prediluiti al 20% (1:5). Ogni campione prediluito è stato usato per produrre altre sei diluizioni (serie di 1 alle potenze di 10). Queste sei fasi di diluizioni sono state esaminate mediante test RIDASCREEN® Norovirus ELISA (in misurazioni triple) e tramite EM e RT-PCR in tempo reale. Sono quindi state calcolate le concentrazioni nelle singole diluizioni ai fini della conta microscopica e della misurazione PCR. Il limite di rilevazione (LoD) è stato determinato alla concentrazione in cui il test ELISA non forniva più un risultato positivo ed è stato identificato come copie di RNA per grammo di feci (PCR) o particelle per grammo di feci (EM).

Nel test RIDASCREEN® Norovirus Test, il LoD per il genogrupo I (GI) è pari a $1,51 \times 10^6$ copie di RNA per grammo di feci ($1,18 \times 10^7$ particelle per grammo di feci), mentre il LoD per il genogrupo II (GII) è pari a $1,99 \times 10^6$ copie di RNA per grammo di feci. Per l'ultima fase di

diluizione GII, non è più stato possibile determinare il numero di particelle mediante elettromicroscopia e pertanto questo valore è stato calcolato dalle fasi di diluizione misurate prima di questo punto. Il risultato del calcolo è stato $1,22 \times 10^6$ particelle per grammo di feci per GII (vedere Tabella 4, colonna a sinistra).

Sulla base dei valori LoD calcolati per grammo di feci, sono stati determinati i limiti di rilevazione (LoD) per le concentrazioni degli analiti nella miscela di reazione (diluizione 1:11 del campione). Per GI, questi risultati erano pari a $1,51 \times 10^5$ copie di RNA per ml di miscela di reazione e $1,18 \times 10^6$ particelle per ml di miscela di reazione. Per GII, questi risultati erano pari a $1,99 \times 10^5$ copie di RNA per ml di miscela di reazione e $1,22 \times 10^5$ particelle per ml di miscela di reazione (vedere Tabella 4, colonna a destra). I risultati sono riepilogati nella Tabella 4.

Tabella 4: LoD con RIDASCREEN® Norovirus

| Genogruppi | Nella diluizione seriale | | Nella miscela di reazione (1 parte di campione (ottenuta dalla diluizione seriale) + 10 parti di diluente Diluent 1) | |
|------------|-------------------------------------|----------------------|---|------------------------|
| | RT-PCR in tempo reale [copie/ml] | EM [particelle/g] | RT-PCR in tempo reale [copie/ml] | EM [particelle/g] |
| GGI | $1,51 \times 10^6^*$ | $1,18 \times 10^7^*$ | $1,51 \times 10^{5**}$ | $1,18 \times 10^{6**}$ |
| GII | $1,99 \times 10^6^*$ | $1,22 \times 10^6^*$ | $1,99 \times 10^{5**}$ | $1,22 \times 10^{5**}$ |

*Calcolato in base all'ultima diluizione con un risultato positivo alla analisi mediante EM o PCR

**Concentrazioni calcolate nella diluizione specifica per il dosaggio con diluente Diluent 1

14 Sostanze interferenti

Le sostanze include nell'elenco seguente non hanno mostrato effetti sui risultati dei test quando miscelate in campioni di feci positivi e negativi al norovirus nelle concentrazioni descritte:

solfo di bario (5% w/w), loperamide (antidiarroico; 5% w/w), Peptobismol (antidiarroico, 5% v/w), mucine (5% w/w), ciclamato (edulcorante artificiale, 5% v/w), sangue umano (5% v/w), miscela di acido stearico e acido palmitico (1:1, 40% w/w), metronidazolo (0,5) (antibiotico 5% v/w), diclofenac (0,00263% v/w).

Appendice

Simboli specifici del test:

| | |
|---------------|------------------------------------|
| Plate | Piastra per microtitolazione |
| Diluent 1 | Tampone di diluizione del campione |
| Wash | Tampone di lavaggio |
| Control + | Controllo positivo |
| Control - | Controllo negativo |
| Conjugate 1 | Coniugato 1 |
| Conjugate 2 | Coniugato 2 |
| Substrate | Substrato |
| Stop | Reagente bloccante |

Letteratura

1. Corwin A. L. et al.: Shipboard impact of a probable Norwalk virus outbreak from coastal Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(6), 898-903 (1999).
2. Daniels N. A. et al.: A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: First molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 1467-70 (2000).
3. Gaulin C. et al.: Transmission of calicivirus by a foodhandler in the pre-symptomatic phase of illness. *Epidemiol. Infect.* 123, 475-478 (1999).
4. Jiang X. et al.: Outbreaks of gastroenteritis in elderly nursing homes and retirement facilities associated with human caliciviruses; *Journal of Medical Virology* 50: 335-341 (1996).
5. Jiang X. et al.: Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein; *Journal of Virology* Vol. 66 No. 11, 6527-6532 (1992).
6. Kohn M. A., MD, et al.: An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters. *Jama* 273, 466-471 (1995).
7. Kukkula M. et al.: Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *The Journal of Infectious Diseases* 180, 1771-1776 (1999).
8. Lodder W. J. et al.: Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in Sewage. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 65 No 12 , 5624-5627 (1999).
9. Otsu R. et al.: Detection of small round structured viruses in stool specimens from outbreaks of gastroenteritis by electron microscopy and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta virologica* 44, 53-55 (2000).
10. Oyofe B. A. et al.: Norwalk-like virus and bacterial pathogens associated with cases of gastroenteritis onboard a U.S. navy ship. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(6), 904-908 (1999).
11. Payment P. et al.: Incidence of Norwalk virus infections during a prospective epidemiological study of drinking water related gastrointestinal illness. *Can. J. Microbiol.* 40, 805-809 (1994).
12. Pönkä A. et al.: An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries. *Epidem. Infect.* 123; 469-474 (1999).
13. Prasad B. V. Venkataram et al.: X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* Vol. 286, (1999).
14. Schreier E. et al.: Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98; *Arch. Virol.* 145, 443-453 (2000).
15. Taylor M. B. et al.: An epidemiological investigation of Norwalk virus infection in South Africa. *Epidemiol. Infect.* 116, 203-206 (1996).
16. Wright Peter J. et al.: Small round-structured (Norwalk-like) viruses and classical human caliciviruses in southeastern Australia, 1980-1996. *Journal of Medical Virology* 55, 312-320 (1998).
17. Zheng D.P. et al. : Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312-323 (2006).

18. Chan M.C.W. et al. : Fecal viral load and Norovirus associated gastroenteritis. Emerging infectious diseases (www.cdc.gov/eid) Vol. 12, No 8 (2006).
19. Román E. et al. : Acute viral gastroenteritis : proportion and clinical relevance of multiple infections in Spanish children. J.Med. Microbiol. 52, 435-440 (2003).
20. Okitsu-Negishi S. et al.: Detection of Norovirus Antigens from recombinant Virus-like particles and stool samples by a commercial Norovirus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit. J.Clin. Microbiol. 44, 3784-3786 (2006)
21. Castriciano S. et al. : Comparison of the RIDASCREEN[®] norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools assayed by RT-PCR and electron microscopy. J.Virol.Methods (2007)