

RIDASCREEN® Norovirus

3ª Geração

Nº do artigo: C1401



R-Biopharm AG An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemanha

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20



1. Uso previsto

Para uso no diagnóstico *in vitro*. RIDASCREEN® Norovirus 3ª Geração é um ensaio imunoenzimático para a identificação qualitativa dos genogrupos de Norovirus I e II em amostras de fezes humanas.

2. Resumo e explicação do teste

Os *Norovirus* são uma importante causa de gastroenterite em todo o mundo, com uma estimativa de 23 milhões de casos por ano nos EUA (1, 2). Eles muitas vezes estão envolvidos quando a infecção irrompe em instituições e comunidades como instalações de cuidados, hospitais, creches infantis e prisões, ou em navios de cruzeiro (3, 4, 5). Embora os surtos de infecção por *Norovirus* possam ser um fardo considerável para a saúde pública, eles são relatados com mais frequência como surtos de infecção bacteriana (6).

A gastroenterite causada por um *Norovirus* apresenta náusea intensa, vômito forte e diarreia grave. Há um período de incubação de 6 a 48 horas, após esse período os sintomas podem persistir durante 12 a 60 horas. A dose infecciosa de apenas 100 partículas do vírus é extremamente baixa, o que fornece as condições para esse vírus se espalhar de forma muito eficaz de pessoa para pessoa. Como o vírus é excretado tanto no vômito quanto nas fezes, a formação de gotículas de aerossol que transportam o vírus torna o percurso aerogênico de transmissão tão significativo quanto a transmissão fecal-oral. Isso é evidente na frequência muito rápida da disseminação da infecção em ambientes comunitários sociais.

Com poucas exceções, o vírus é excretado por um período de cerca de duas semanas, o que cria um risco adicional de mais contágio. A reinfecção pelo *Norovirus* é possível, não sem relevo, porque a variabilidade acentuada não permite uma imunidade completa.

Os métodos usuais de diagnóstico da análise de amostras de fezes estão limitados à microscopia eletrônica ou principalmente à identificação molecular do genoma por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Como esses métodos são relativamente exigentes, também exigindo conhecimentos especializados e equipamentos de laboratório técnico específicos, é necessário um teste de triagem mais simples e mais rápido. Já em sua terceira geração de desenvolvimento contínuo, este ELISA é uma resposta altamente relevante para esse desafio. O RIDASCREEN® *Norovirus* ELISA com anticorpos monoclonais permite uma identificação muito específica e altamente sensível dos dois genogrupos de *Norovirus*.

3. Princípio do teste

O teste RIDASCREEN® *Norovirus* 3ª geração emprega anticorpos específicos em um método do tipo sanduíche. A superfície da placa de micropoços é revestida com anticorpos específicos aos antígenos de diversos genótipos diferentes.

Usa-se uma pipeta para posicionar uma suspensão da amostra de fezes para ser examinada, bem como os controles no poço da placa de micropoços, juntamente com anticorpos

monoclonais anti-Norovirus biotinados (Conjugado 1) para incubação à temperatura ambiente (20 - 25 °C). Depois de uma etapa de lavagem, o conjugado de estreptavidina poli-peroxidase (Conjugado 2) é adicionado e incubado novamente à temperatura ambiente (20 - 25 °C). Com a presença de Norovirus em uma amostra de fezes, um complexo de sanduíche formará o que consiste em anticorpos imobilizados, os antígenos de Norovirus, e os anticorpos conjugados com o complexo biotina-estreptavidina-peroxidase. Outra etapa de lavagem remove o conjugado de estreptavidina poli-peroxidase não ligado. Em amostras positivas, a adição de um substrato muda a enzima ligada, de uma solução incolor para uma solução azul. A adição de um reagente de parada muda a cor de azul para amarelo. A extinção é proporcional à concentração de antígenos de Norovirus encontrados na amostra.

4. Reagentes fornecidos

Os reagentes do kit são suficientes para 96 determinações.

Plate	96	Placa de micropoços, 12 tiras de micropoços (que podem ser divididas) no suporte para tiras; revestida com anticorpos monoclonais para anti-Norovirus.
Diluent 1	100 ml	Tampão de diluição de amostra, solução de NaCl tamponada com proteína, pronto para usar, cor azul
Wash	100 ml	Tampão de lavagem, solução de NaCl tamponada com fosfato (concentrada 10 vezes); contém 0,1% de timerosal
Control +	2 ml	Controle positivo (proteína da cápside de <i>Norovirus</i> inativada); pronto para usar
Control -	2 ml	Controle negativo (tampão de diluição da amostra); pronto para usar
Conjugate 1	13 ml	Anticorpos anti-Norovirus conjugados a biotina em solução de proteína estabilizada; prontos para usar, cor azul
Conjugate 2	13 ml	Conjugado de estreptavidina poli-peroxidase em solução de proteína estabilizada; pronto para usar; cor laranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrogênio/TMB; pronto para usar
Stop	12 ml	Reagente de parada; 1 N de ácido sulfúrico; pronto para usar

5. Reagentes e sua armazenagem

Todos os reagentes devem ser armazenados a 2 - 8 °C e podem ser usados até a data impressa na etiqueta. Desde que o tampão de lavagem diluído seja armazenado a 2 - 8 °C, ele pode ser

usado por, no máximo 4 semanas. Deve-se evitar a contaminação microbiana. Após a data de expiração, a garantia da qualidade já não é válida.

A bolsa de alumínio deve ser aberta com tesoura de forma que a vedação de grampo não seja rasgada. As tiras de micropoços que não forem necessárias devem ser recolocadas em uma bolsa de alumínio imediatamente e armazenadas a 2 - 8 °C.

O substrato incolor deve ser protegido contra a luz solar direta, para impedir que se decomponha ou fique azul devido à auto-oxidação. Depois que o substrato fica azul, ele não pode mais ser utilizado.

6. Reagentes adicionais necessários – e equipamento necessário

6.1. Reagentes fornecidos

- Água destilada ou deionizada

6.2. Equipamento

- Tubos de ensaio
- Pipetas descartáveis (Artigo no: Z0001)
- Misturador de vórtice (opcional, consulte 9.3.)
- Micropipeta para volumes de 50 - 100 µl e 1 ml
- Cilindro de medição (1.000 ml)
- Cronômetro
- Dispositivo de lavagem para placas de micropoços ou pipetas multicanal (300 µl)
- Fotômetro para placas de micropoços (450 nm e filtro de referência de 620 - 650 nm)
- Papel filtro (toalhas para laboratório)
- Contêiner de resíduos com uma solução de 0,5% de hipoclorito

7. Precauções de uso

Somente para uso no diagnóstico *in vitro*.

Este ensaio só deve ser realizado por profissionais de laboratório treinados. As diretrizes para trabalhar em laboratórios médicos devem ser seguidas. Sempre siga rigorosamente as instruções para os usuários referentes a este teste.

As amostras ou reagentes não devem ser pipetados com a boca, e o contato com a pele ferida ou com membranas mucosas deve ser evitado. Use equipamento de proteção pessoal (luvas adequadas, avental, óculos de segurança) ao manusear as amostras e lave as mãos depois de concluir o teste. Não fume, coma ou beba nas áreas onde amostras ou reagentes estão sendo processados.

Para ver mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com.

O controle positivo no kit contém proteína da cápside de Norovirus inativada. Ela deve ser tratada como material potencialmente infeccioso e manuseada de acordo com as normas de segurança nacionais, assim como a amostra do paciente.

O tampão de lavagem contém 0,1% de timerosal como conservante. Não se deve permitir que essa substância entre em contato com a pele ou membranas mucosas.

Garanta o descarte adequado e responsável de todos os reagentes e materiais após o uso. Para o descarte, siga os regulamentos nacionais.

8. Coleta e armazenagem de amostras

As amostras de fezes devem ser tomadas assim que possível, mas dentro de três dias após a ocorrência dos sintomas iniciais de diarreia. Até o momento da utilização, armazene o material de teste a 2 - 8 °C. Se não for possível usar o material para um teste dentro de três dias, recomendamos a armazenagem a -20 °C ou menos. Evite congelar e descongelar a amostra repetidamente. Depois de diluir uma amostra de fezes no tampão de diluição de amostra 1:11, ela pode ser armazenada a 4 °C para uso dentro de sete dias.

As amostras de fezes e esfregaços fecais não devem ser coletadas em contêineres de transporte contendo meios conservantes, soros animais, íons metálicos, agentes oxidantes ou detergentes, já que podem interferir no teste RIDASCREEN® Norovirus 3ª Geração.

Se esfregaços retais forem utilizados, certifique-se de que o volume de material fecal seja suficiente (aprox. 100 mg) para o teste.

O rastreio do contato deve incluir amostras de fezes tomadas de pessoas de contato que não apresentam sintomas clínicos, para identificar portadores assintomáticos.

9. Procedimentos do teste

9.1. Informações gerais

Todos os reagentes e o micropoço **Plate** devem atingir a temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes do uso. As tiras de micropoços não devem ser removidas da bolsa de alumínio até atingir a temperatura ambiente. Os reagentes devem ser misturados totalmente imediatamente antes do uso. Depois do uso, as tiras de micropoços (colocadas em bolsas vedadas) e os reagentes devem ser armazenados a 2 - 8 °C. Depois de usadas, as tiras de micropoços não podem ser usadas novamente. Os reagentes e as tiras de micropoços não devem ser usados se a embalagem estiver danificada ou os frascos estiverem vazando.

Para evitar a contaminação cruzada, deve-se impedir que as amostras entrem em contato com os componentes do kit.

O teste não deve ser realizado sob luz solar direta. Recomendamos a cobertura da tira de micropoços ou o envolvimento em plástico para evitar perdas por evaporação.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

Misture 1 parte de concentrado de tampão de lavagem **Wash** com 9 partes de água destilada. Quaisquer cristais presentes no concentrado deverão ser dissolvidos previamente aquecendo em banho-maria a 37 °C.

9.3. Preparação das amostras

Encha um tubo de ensaio com 1 ml de **Diluent | 1** tampão de diluição da amostra RIDASCREEN®. Use uma pipeta descartável (artigo no Z0001) para sugar uma amostra fina de fezes (aprox. 100 µl) até um ponto logo acima da segunda marcação e adicione ao tampão no tubo de ensaio para fazer uma suspensão. Para fazer uma suspensão com uma amostra de fezes sólidas, adicione uma quantidade equivalente (aprox. 50 - 100 mg) com uma espátula ou ansa de inoculação descartável.

Homogeneíze a suspensão de fezes por sucção e ejeção com uma pipeta ou, como alternativa, misture com um misturador Vortex. Deixe a suspensão descansar por um breve período (10 minutos) para que as partículas grossas de fezes assentem, e esse sobrenadante clarificado da suspensão de fezes pode ser usado diretamente no teste. Caso o procedimento do teste seja realizado em um sistema ELISA automatizado, o sobrenadante deve **obrigatoriamente** estar livre de partículas. Nesse caso, é recomendável centrifugar a amostra a 2.500 G durante 5 minutos.

Observação:

Amostras de fezes diluídas em **Diluent | 1** podem ser testadas em todos os RIDASCREEN® ELISA para os quais o **Diluent | 1** é utilizado.

9.4. Primeira incubação

Depois de inserir um número suficiente de poços no suporte para tiras, use uma pipeta para adicionar 100 µl do positivo **Control | +**, do negativo **Control | -**, ou da suspensão da amostra das fezes aos poços. Em seguida, adicione 100 µl do anticorpo conjugado à biotina **Conjugate | 1** e misture (batendo levemente no lado da placa); depois, incube por 60 minutos à temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.5. Lavagem

Lavar cuidadosamente é importante para a obtenção de resultados corretos. Portanto, siga rigorosamente as instruções. A substância incubada nos poços deve ser esvaziada em um contêiner de resíduos para o descarte de acordo com os regulamentos locais. Depois disso, deite a placa em um papel absorvente para remover a umidade residual. Em seguida, lave a placa cinco vezes usando 300 µl de tampão de lavagem em cada vez. Certifique-se de que os poços sejam totalmente esvaziados, deitando-os, após cada lavagem, em uma parte do papel absorvente que ainda esteja seca e não tenha sido usada.

Se você usa uma lavadora de microplacas ou um ELISA totalmente automatizado, certifique-se de que a máquina esteja ajustada corretamente; se necessário, solicite os ajustes do fabricante. Os aparelhos que a R-Biopharm fornece já estão programados com ajustes e protocolos de controle validados. Para evitar o entupimento das agulhas de lavagem, entregue somente suspensões de fezes livres de partícula (consulte o Item 9.3., Preparação das amostras). Além disso, certifique-se de que todo o líquido seja aspirado durante cada etapa de lavagem.

9.6. Segunda incubação

Use uma pipeta para colocar 100 µl de conjugado de estreptavidina poli-peroxidase **Conjugate | 2** nos poços e, em seguida, incube durante 30 minutos à temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.7. Lavagem

Lave conforme o descrito no Item 9.5.

9.8. Terceira incubação

Encha todos os poços com 100 µl de substrato Substrate. Incube a placa por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente (20 - 25°C). Em seguida, coloque 50 µl de reagente de parada em todos os poços Stop fim de parar a reação. Depois de misturar cuidadosamente ao bater ligeiramente no lado da placa, meça a extinção a 450 nm (opcional: 450/620 nm). Ajuste o ponto zero no ar, ou seja, sem a placa de micropoços.

Observação:

Amostras altamente positivas de pacientes podem provocar precipitados de cor preta do substrato.

10. Controle de qualidade - indicações da expiração do reagente

Para fins de controle de qualidade, controles positivos e negativos devem ser usados cada vez que o teste é realizado, para garantir que os reagentes estejam estáveis e que o teste seja realizado corretamente. O teste foi realizado corretamente se a taxa de extinção (O. D.) do controle negativo é inferior a 0,2 a 450 nm (inferior a 0,160 a 450/620 nm) e o valor medido para o controle positivo é maior que 0,8 a 450 nm ou a 450/620 nm. Um valor superior a 0,2 (0,160) para o controle negativo pode indicar que a lavagem foi insuficiente. O desvio os valores exigidos, bem como uma cor turva ou azul do substrato incolor antes que seja colocado nos poços pode indicar que os reagentes expiraram.

Se os valores estipulados não forem obtidos, verifique os pontos a seguir antes de repetir o teste:

- Data de expiração dos reagentes usados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo usado (por exemplo: calibragem)

- Procedimento de teste correto
- Inspeção visual dos componentes do kit à procura de contaminação ou vazamentos - a solução de substrato que se torna azulada não deve ser usada.

Se mesmo assim as condições não forem preenchidas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor local da R-Biopharm.

11. Avaliação e interpretação

11.1. Cálculo do corte

Para estabelecer o corte, 0,15 unidade de extinção é adicionada à extinção medida para o controle negativo.

$$\text{Corte} = \text{extinção para o controle negativo} + 0,15$$

11.2. Resultados do teste

A avaliação da amostra é **positiva** se a taxa de extinção é mais do que 10% superior ao valor de corte calculado.

A avaliação da amostra é **marginal** se a taxa de extinção varia entre 10% menor e 10% maior que o valor de corte. Se a repetição do exame com uma nova amostra de fezes fica novamente na zona cinza, a avaliação da amostra é negativa.

Amostras com extinções mais de 10% abaixo do corte calculado devem ser consideradas **negativas**.

12. Limitações do método

O teste RIDASCREEN® Norovirus 3ª Geração identifica antígenos do Norovirus em amostras de fezes, detectando os genótipos (I e II) que a doença causa no ser humano. Nem todos os genótipos e os subtipos relacionados foram testados, mas podem ser detectados quase todos os genótipos conhecidos de surtos de gastroenterite até esse momento, enquanto a carga viral na amostra não varia abaixo do limite de detecção do ELISA no tempo de coleta de amostras. Não é possível associar o nível determinado de extinção à ocorrência ou gravidade dos sintomas clínicos. **Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em conjunto com o quadro clínico.** É possível para pessoas assintomáticas excretarem o vírus, e elas podem ser encontradas com este ELISA (rastreamento de contato). A carga viral disponível é sempre decisiva.

Um resultado **positivo** não descarta a presença de outros patógenos infecciosos. A literatura descreve de maneira suficiente infecções duplas e múltiplas com potenciais patógenos de gastroenterite, e podem ser diagnosticadas por métodos diferenciais. Em muitos casos, os sinais e os sintomas clínicos são mais pronunciados do que aqueles com origens monocausais.

Um resultado **negativo** não descarta a possibilidade de infecção por Norovirus. Isso pode ser explicado pela excreção intermitente do vírus, coleta de amostras em um ponto de mal adaptado no tempo (consulte o item 8 “Coleta e armazenamento de amostras”), uma carga viral mínima, ou por manuseio inadequado da amostra. Se a anamnese do paciente respalda a suspeita de infecção por Norovirus, deve-se repetir o exame com outra amostra de fezes.

Um resultado **marginal** pode ser explicado pela distribuição não homogênea de vírus na amostra de fezes, carga viral no limite de ELISA no início, ou lavagem insuficiente dos micropoços, ou pode indicar que a infecção está em regressão. Nesse caso, o exame deve ser repetido com uma segunda suspensão da mesma amostra ou outra amostra de fezes deve ser solicitada.

O RIDASCREEN® Norovirus ELISA não é validado para amostras de mecônio neste momento, por isso os resultados desses ensaios devem ser interpretados com cautela. Uma grande variedade de produtos de cuidados infantis, como cremes, óleos e pomadas que podem transferir da fralda para as amostras de fezes na coleta de amostras foram utilizadas para fortalecer as amostras de fezes negativas para Norovirus e não foram capazes de afetar os resultados da análise. Nem as amostras de fezes positivas para Norovirus foram afetadas negativamente quando testadas com os produtos de marca.

13. Características de desempenho

13.1. Qualidade do teste

Um estudo de validação com o RIDASCREEN® Norovirus ELISA 3ª Geração envolveu 60 amostras que foram analisadas por reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), no âmbito da prática de diagnóstico de rotina durante a temporada de inverno de 2004/2005 no Instituto de Virologia, Dresden University of Technology, onde foram posteriormente congeladas (-20 °C) e armazenadas. Outras 123 amostras da temporada de inverno de 2006 (janeiro a maio) também foram identificados por RT-PCR, em seguida, congeladas e armazenadas para uso posterior. Os resultados de ambos os painéis de amostras foram resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Correlação entre o RIDASCREEN® Norovirus ELISA 3ª Geração e o RT-PCR

		Painel do RIDASCREEN® TI 2004/5		Painel do RIDASCREEN® TI 2006	
		+	-	+	-
RT-PCR	+	28	2	55	15
	-	0	30	0	53

Sensibilidade:	93,3 %	78,6 %
Especificidade:	100,0 %	100,0 %
Valor preditivo positivo (VPP):	100,0 %	100,0 %

Valor preditivo negativo (VPN):	93,8 %	77,9 %
Precisão:	96,7 %	87,8 %

13.2. Reatividade cruzada

Diversos micro-organismos patogênicos do trato intestinal foram examinados com o RIDASCREEN® Rotavírus ELISA. Esses estudos foram realizados com suspensões não diluídas de vírus ou bactérias que comprovadamente tinham concentrações de 10⁶ a 10⁹ organismos por ml. Os resultados desse estudo são resumidos na Tabela 2.

Tabela 2: Reatividade cruzada com micro-organismos patogênicos

Organismo	Origem	[OD 450/620]
Adenovírus	Sobrenadante da cultura de células	0,010
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cultura	0,007
<i>Bacillus cereus</i>	Cultura	0,007
<i>Bacteroides fragilis</i>	Cultura	0,025
<i>Campylobacter coli</i>	Cultura	0,002
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultura	0,005
<i>Candida albicans</i>	Cultura	0,004
<i>Citrobacter freundii</i>	Cultura	0,002
<i>Clostridium difficile</i>	Cultura	0,002
<i>Clostridium perfringens</i>	Cultura	0,002
<i>Clostridium sordellii</i>	Cultura	0,003
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Cultura	0,004
<i>E. coli</i> (O6)	Cultura	0,003
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Cultura	0,000
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cultura	0,002
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultura	0,007
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultura	0,008
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultura	0,008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	0,009
Rotavírus	Sobrenadante da cultura de células	0,010
<i>Salmonella enteritidis</i>	Cultura	0,007
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cultura	0,007
<i>Serratia liquefaciens</i>	Cultura	0,005
<i>Shigella flexneri</i>	Cultura	0,007

<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura	0,007
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cultura	0,009
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cultura	0,008

13.3. Precisão:

A reprodutibilidade do RIDASCREEN® Norovirus ELISA foi testada com seis referências que representam toda a faixa de medição, de fraco ao altamente positivo. Para determinar a reprodutibilidade intraensaio, 40 réplicas dessas referências foram testadas. Os valores médios e o coeficiente de variação (VC) de três lotes dos kits foram determinados. Para a reprodutibilidade intraensaio, foram testadas referências de dez dias úteis diferentes em duplicadas, com duas execuções por dia. As medições foram determinadas por três técnicos e se referem a três lotes de kits. A reprodutibilidade entre os lotes foi determinada para todos os três lotes dos kits. Como esperado, os resultados da Referência 6 foram negativos em todas as análises. Os resultados desse estudo são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Precisão do RIDASCREEN® Norovirus ELISA

Referências Valor médio [OD 450/620]/ VC		Intraensaio			Entre ensaios			Entre lotes
		Lote de kits 1	Lote de kits 2	Lote de kits 3	Lote de kits 1	Lote de kits 2	Lote de kits 3	Lote de kits 1-3
1	MV	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	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	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	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	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	0,009	0,022	0,036	0,019	0,017	0,011	0,016
	VC (%)	N/D						

13.4 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do RIDASCREEN® Norovirus ELISA foi determinada para duas amostras de fezes nativas (cada uma para os genogrupos I e II), em que as amostras haviam sido testadas anteriormente para as concentrações de Norovirus por microscópio eletrônico (ME), bem como por RT-PCR em tempo real. Para obter uma concentração de vírus apropriada para os exames por PCR e ME, ambas as amostras foram pré-diluídas inicialmente a 20% (1:5). Cada amostra pré-diluída foi usada para produzir mais seis diluições (séries de 1 a potências de 10). Estas seis etapas de diluição foram examinadas por meio do RIDASCREEN® Norovirus ELISA (em medições triplas) e por ME e RT-PCR em tempo real. As concentrações em diluições individuais foram então calculadas pela contagem microscópica e pela medição de PCR. O limite de detecção (LoD) foi determinado na concentração em que o ELISA não apresentou um resultado positivo e foi indicado como as cópias de RNA por grama de fezes (PCR) ou pelas partículas por grama de fezes (ME).

No teste RIDASCREEN® Norovirus, o LoD para o genogrupo I (GI) é de $1,51 \times 10^6$ cópias de RNA por grama de fezes ($1,18 \times 10^7$ partículas por grama de fezes) e LoD para o genogrupo II (GII) é de $1,99 \times 10^6$ cópias de RNA por grama de fezes. Para a última etapa de diluição do GII, o número de partículas não pôde mais ser determinado por microscópio eletrônico, de modo que este valor foi calculado a partir dos etapas de diluição medidas antes deste ponto. O resultado desse cálculo foi $1,22 \times 10^6$ partículas por grama de fezes para GII (consulte a Tabela 4, coluna da esquerda).

Com base nos valores do LoD calculados por grama de fezes, os limites de detecção (LoD) foram determinados para concentrações dos analitos na mistura de reação (diluição de 1:11 da amostra). Para o GI, esses resultados foram $1,51 \times 10^5$ cópias de RNA por mistura de reação por ml e $1,18 \times 10^6$ partículas por mistura de reação por ml. Para o GII, esses resultados foram $1,99 \times 10^5$ cópias de RNA por mistura de reação por ml e $1,22 \times 10^5$ partículas por mistura de reação por ml (consulte a Tabela 4, lado direito). Todos os resultados são resumidos na Tabela 4.

Tabela 4: LoD com RIDASCREEN® Norovirus

Genogrupos	Na diluição em série		Na mistura de reação (1 amostra por parte (da diluição em série) + 10 partes de Diluent 1)	
	RT-PCR em tempo real [cópias/ml]	ME [partículas/g]	RT-PCR em tempo real [cópias/ml]	ME [partículas/g]
GGI	$1,51 \times 10^6^*$	$1,18 \times 10^7^*$	$1,51 \times 10^{5**}$	$1,18 \times 10^{6**}$
GII	$1,99 \times 10^6^*$	$1,22 \times 10^6^*$	$1,99 \times 10^{5**}$	$1,22 \times 10^{5**}$

*Cálculo com base na última diluição com resultado positivo em ME ou PCR

**Concentrações calculadas em diluição específica do ensaio em Diluent 1

14. Substâncias interferentes

As substâncias da lista a seguir não apresentaram efeitos sobre os resultados do teste quando misturadas às amostras de fezes positivas e negativas do Norovirus nas concentrações descritas: sulfato de bário (5% w/w [peso/ peso]), loperamida (medicamento antidiarreico 5% w/w), Pepto-Bismol (medicamento antidiarreico, 5% v/w [volume/ peso]), mucinas (5% w/w), ciclamato (adoçante artificial, 5% v/w), sangue humano (5% v/w), mistura de ácido esteárico e ácido palmítico (mistura 1:1, 40% w/w), metronidazol (0,5) (antibiótico 5% v/w), diclofenaco (0,00263% v/w).

Apêndice

Símbolos específicos do teste:

Plate	Placa de micropoços
Diluent 1	Tampão de diluição da amostra
Wash	Tampão de lavagem
Control +	Controle positivo
Control -	Controle negativo
Conjugate 1	Conjugado 1
Conjugate 2	Conjugado 2
Substrate	Substrato
Stop	Reagente de parada

Bibliografia

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)