

RIDASCREEN[®] Norovirus

3rd Generation

Art. No.: C1401



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



1. Anwendungsbereich

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDASCREEN® Norovirus ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von Noroviren der Genogruppen I und II in humanen Stuhlproben.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Noroviren sind eine weltweit bedeutende Ursache von Gastroenteritis mit geschätzt 23 Millionen jährlichen Fällen in den USA (1, 2). Sie sind häufig an Ausbrüchen in Gemeinschaftseinrichtungen wie Pflegeheimen, Krankenhäusern, Kindertagesstätten, Gefängnissen und auf Kreuzfahrtschiffen (3, 4, 5) beteiligt. Ausbrüche mit Noroviren werden häufiger berichtet als Ausbrüche durch bakterielle Erreger und können einen beachtlichen Einfluss auf die öffentliche Gesundheit ausüben (6).

Eine durch Noroviren verursachte Gastroenteritis äußert sich durch starke Übelkeit, heftiges Erbrechen und schweren Durchfall. Die Inkubationszeit liegt zwischen 6 und 48 Stunden, wobei die Symptome anschließend 12 - 60 Stunden anhalten können. Die Infektionsdosis ist mit nur 100 Viruspartikeln äußerst gering, womit die Voraussetzung für eine sehr effektive Verbreitung von Mensch zu Mensch gegeben ist. Da das Virus sowohl mit dem Stuhl als auch mit dem Erbrochenen ausgeschieden wird, ist neben der fäkal-oralen Übertragung auch eine aerogene Übertragung durch Bildung virushaltiger Aerosole von Bedeutung. Dies zeigt sich durch die häufig sehr rasche Ausbreitung in Gemeinschaftseinrichtungen.

Bis auf wenige Ausnahmen hält die Virusausscheidung etwa 2 Wochen an und birgt so zusätzlich die Gefahr weiterer Verbreitung. Reinfektionen sind möglich, da nicht zuletzt die ausgeprägte Variabilität der Noroviren keine umfassende Immunität zulässt.

Die meist aus der Stuhlprobe durchgeführte Diagnostik ist neben der Elektronenmikroskopie hauptsächlich auf den molekularen Genomnachweis mittels PCR begrenzt. Da diese Methoden relativ aufwändig sind und besondere Expertise und labortechnische Ausstattung benötigen, ist ein einfacher und schneller Screeningtest wünschenswert. Mit dem vorliegenden und schon in der dritten Generation weiterentwickelten ELISA wird dieser Forderung in hohem Maße Rechnung getragen. Der RIDASCREEN® Norovirus ELISA mit monoklonalen Antikörpern ermöglicht einen sehr spezifischen und hochsensitiven Nachweis von Noroviren beider Genogruppen.

3. Testprinzip

Im RIDASCREEN® Norovirus-Test werden spezifische monoklonale Antikörper in einem Sandwichverfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte sind spezifische Antikörper gegen Antigene mehrerer unterschiedlicher Genotypen gebunden.

Eine Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe sowie die Kontrollen werden zusammen mit biotinylierten monoklonalen Anti-Norovirus-Antikörpern (Konjugat 1) bei Raumtemperatur (20 - 25°C) zur Inkubation in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einem Waschschritt wird Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat (Konjugat 2) dazu gegeben und erneut bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert. Bei Anwesenheit von Noroviren in der Stuhlprobe bildet sich ein Sandwich-Komplex aus immobilisierten Antikörpern, den Norovirus-Antigenen und den

mit dem Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Komplex konjugierten Antikörpern. Nicht gebundenes Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration der in der Probe vorhandenen Noroviren.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen

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

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfalldatum verwendungsfähig. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 – 8 °C für 4 Wochen haltbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfalldatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.

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

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

6.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

6.2. Zubehör

- Probenröhrchen
- Einwegpipetten (Art. Nr.: Z0001)
- Vortex Mixer (optional, siehe 9.3.)
- Mikropipette für 50 – 100 µl und 1 ml Volumina
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter 620-650 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter mit einer 0,5%igen Hypochlorit Lösung

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren, Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Proben persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Weitere Details siehe Material Safety Data Sheets (MSDS) www.r-biopharm.com.

Die im Kit befindliche Positivkontrolle enthält inaktiviertes Norovirus Capsidprotein. Sie sollte, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den nationalen Sicherheitsbestimmungen behandelt werden.

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

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

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Stuhlproben müssen so bald als möglich nach Auftreten von Durchfallssymptomen innerhalb von 3 Tagen gewonnen werden. Das Untersuchungsmaterial ist bis zur Verarbeitung bei 2 - 8 °C zu

lagern. Kann das Material nicht innerhalb von 3 Tagen im Test eingesetzt werden, wird eine Lagerung bei -20 °C oder kälter empfohlen. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden. Eine im Probenverdünnungspuffer 1:11 verdünnten Stuhlprobe ist bei 4 °C bis zu 7 Tagen haltbar.

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

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

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

9. Testdurchführung

9.1. Allgemeines

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

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

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

9.2. Herstellung des Waschpuffers

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

9.3. Vorbereitung der Proben

In ein gekennzeichnetes Teströhrchen wird 1 ml RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent 1** vorgelegt. Flüssiger Stuhl wird in eine Einwegpipette (Art. Nr. Z0001) bis kurz oberhalb der zweiten Markierung aufgesaugt (ca. 100 µl) und im vorgelegten Puffer suspendiert. Bei festem Stuhl wird eine äquivalente Menge Stuhl (ca. 50 - 100 mg) mit einem Spatel oder einer Einweg-Impföse entnommen und suspendiert. Das Homogenisieren der Stuhlsuspension erfolgt entweder durch Aufsaugen und Ausstoßen mit der Einwegpipette oder alternativ durch Mischen

auf einem Vortex Mixer. Nach kurzem Stehenlassen (10 min) zur Sedimentation grober Stuhlpartikel kann der auf diese Weise geklärte Überstand der Stuhlsuspension direkt im Test eingesetzt werden. Erfolgt die Testdurchführung in einem ELISA-Automaten muss dieser Überstand partikelfrei sein. In diesem Fall empfiehlt sich eine Zentrifugation bei 2500 G für 5 Minuten.

Hinweis :

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

9.4. Erste Inkubation

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

9.5. Waschen

Sorgfältiges Waschen ist wichtig zur Erzielung korrekter Ergebnisse und sollte daher strikt nach Anleitung erfolgen. Das Inkubat in den Kavitäten sollte zunächst in einen Abfallbehälter entleert und gemäß den behördlichen Vorschriften entsorgt werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

Bei der Verwendung von Waschautomaten oder ELISA-Vollautomaten ist die korrekte Einstellung des Gerätes zu beachten bzw. beim Hersteller zu erfragen. Geräte, die R-Biopharm liefert, sind bereits mit validierten Einstellungen und Arbeitsprotokollen programmiert. Um Verstopfungen von Waschnadeln zu vermeiden sollten gemäß der Probenvorbereitung (Pkt. 9.3.) nur partikelfreie Stuhlsuspension eingesetzt werden. Bei den Waschschrritten muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden.

9.6. Zweite Inkubation

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

9.7. Waschen

Waschen gemäß Pkt. 9.5.

9.8. Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl Substrat **Substrate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) im Dunkeln inkubiert. Danach wird durch Zugabe

von 50 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm gemessen (optional: 450/620 nm). Der Abgleich des Nullwertes sollte gegen Luft - also ohne Mikrotiterplatte - erfolgen.

Hinweis:

Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Substrates verursachen.

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positiv- und Negativkontrolle mitzuführen, um Reagenzien-Stabilität und korrekte Testdurchführung sicherzustellen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (O.D.) der Negativkontrolle bei 450 nm kleiner 0,2 (kleiner 0,160 bei 450/620 nm) und der gemessene Wert der Positivkontrolle bei 450 nm oder bei 450/620 nm größer 0,8 ist. Ist der Wert der Negativkontrolle größer 0,2 (0,160) kann dies ein Zeichen für ungenügendes Waschen sein. Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

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

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

11. Auswertung und Interpretation

11.1. Berechnung des Grenzwertes

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

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

11.2. Testergebnis

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

Als grenzwertig und zu wiederholen werden solche Proben bezeichnet, deren Extinktionswert im Bereich von 10 % oberhalb und unterhalb des Grenzwertes liegt. Fällt eine Wiederholungs-

untersuchung mit einer frischen Stuhlprobe wieder in den Graubereich, so ist die Probe als negativ zu beurteilen.

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

12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® Norovirus-Test weist Antigene von *Noroviren* der beiden humanpathogenen Genogruppen 1 und 2 in Stuhlproben nach. Obwohl nicht alle Genotypen mit den dazugehörigen Subtypen getestet wurden, werden nahezu alle bisher in Gastroenteritisausbrüchen bekannt gewordenen Genotypen erfasst, sofern zum Zeitpunkt der Probengewinnung die Viruslast in der Probe nicht unter der Nachweisgrenze des ELISA liegt. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Extinktionswertes und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren. Es gibt auch asymptomatische Virusausseider (Umgebungsuntersuchung), die mit dem ELISA erfasst werden können. Entscheidend ist immer die jeweils vorliegende Viruslast.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger nicht aus. Doppel- und Mehrfachinfektionen potentieller Gastroenteritiserreger sind hinreichend beschrieben und können differentialdiagnostisch ermittelt werden. Die klinische Symptomatik ist in solchen Fällen vielfach stärker ausgeprägt als bei monokausaler Ursache.

Ein negatives Ergebnis schließt eine mögliche Norovirus-Infektion nicht aus. Es kann durch intermittierende Ausscheidung des Virus, durch Probengewinnung zu einem ungeeigneten Zeitpunkt (s.Pkt.8 „Sammlung und Lagerung der Proben“), durch eine zu geringe Viruslast oder durch eine unsachgemäße Handhabung der Probe verursacht sein. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine Infektion mit Noroviren, sollte eine weitere Stuhlprobe untersucht werden.

Ein grenzwertiges Ergebnis kann durch eine inhomogene Verteilung des Virus in der Stuhlprobe, durch eine für den ELISA grenzwertige Viruslast zu Beginn oder beim Abklingen der Infektion oder durch ungenügendes Waschen der Mikrotiterwells verursacht werden. Deshalb sollte in einem solchen Fall eine zweite Suspension aus der gleichen Probe untersucht werden oder eine weitere Stuhlprobe zur Untersuchung angefordert werden.

Mekonium-Proben wurden bislang nicht mit dem RIDASCREEN® Norovirus ELISA validiert und sind insofern mit Vorsicht zu interpretieren. Ein Einfluss verschiedener Säuglingspflegemittel wie Cremes, Öle und Salben, die bei der Stuhlgewinnung aus Windeln mit in die Probe gelangen können, wurde anhand von mit diesen Mitteln gespickten Norovirus-negativen Stuhlproben bislang nicht beobachtet. Ebenso wurden Norovirus-positive Stuhlproben durch die getesteten Markenprodukte nicht negativ beeinträchtigt.

13. Leistungsmerkmale

13.1. Testqualität

In einer Validierungsstudie mit dem RIDASCREEN® Norovirus ELISA 3rd Generation kamen 315 Proben zum Einsatz, die im Rahmen der Routinediagnostik in einem deutschen Labor untersucht wurden. Die Prävalenz für Norovirus lag bei 6.3 %. Die Ergebnisse dieses Probenpanels sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab 1: Korrelation des RIDASCREEN® Norovirus ELISA 3rd Generation mit der Routinediagnostik eines deutschen Labors

		Routinemethode	
		+	-
RIDASCREEN® Norovirus ELISA 3 rd Generation	+	14	6
	-	6	289

Positive Übereinstimmung: 70,0 %
 Negative Übereinstimmung: 98,0 %
 Prävalenz: 6,3 %

13.2. Kreuzreaktivität

Verschiedene pathogene Keime des Intestinaltraktes wurden mit dem RIDASCREEN® Norovirus ELISA untersucht. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit unverdünnten Bakterien- oder Virus-Suspensionen, die eine Konzentration von 10⁶ bis 10⁹ Organismen pro ml aufwiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Kreuzreaktionen mit pathogenen Mikroorganismen

Testkeim	Herkunft	[OD 450/620]
<i>Adenovirus</i>	Zellkulturüberstand	0,010
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Kultur	0,007
Astrovirus	Zellkulturüberstand	0,012
<i>Bacillus cereus</i>	Kultur	0,007
<i>Bacteroides fragilis</i>	Kultur	0,025
<i>Campylobacter coli</i>	Kultur	0,004
<i>Campylobacter jejuni</i>	Kultur	0,005
<i>Candida albicans</i>	Kultur	0,004
<i>Citrobacter freundii</i>	Kultur	0,002
<i>Clostridium difficile</i>	Kultur	0,002
<i>Clostridium perfringens</i>	Kultur	0,002
<i>Clostridium sordellii</i>	Kultur	0,003
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Kultur	0,000

<i>E. coli</i> (O26:H-)	Kultur	0,004
<i>E. coli</i> (O6)	Kultur	0,003
<i>Enterobacter cloacae</i>	Kultur	0,002
<i>Enterococcus faecalis</i>	Kultur	0,007
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Kultur	0,008
<i>Proteus vulgaris</i>	Kultur	0,008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kultur	0,009
<i>Rotavirus</i>	Zellkulturüberstand	0,010
<i>Salmonella enteritidis</i>	Kultur	0,007
<i>Salmonella typhimurium</i>	Kultur	0,007
<i>Serratia liquefaciens</i>	Kultur	0,005
<i>Shigella flexneri</i>	Kultur	0,007
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kultur	0,007
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kultur	0,049
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Kultur	0,009
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Kultur	0,008

13.3. Präzision:

Die Reproduzierbarkeit des RIDASCREEN® Norovirus ELISA wurde mit sechs Referenzen, die den gesamten Messbereich von negativ bis hoch positiv abdecken, durchgeführt. Zur Bestimmung der Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurden 40 Replikate dieser Referenzen gemessen. Die Mittelwerte und die Variationskoeffizienten (VK) wurden für 3 Kit Lots ermittelt. Für die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurden die Referenzen an 10 verschiedenen Arbeitstagen mit 2 Läufen am Tag in Duplikaten gemessen. Die Messungen wurden mit 3 Kit Lots und von 3 Technikern durchgeführt. Die Inter-Lot Reproduzierbarkeit wurde über alle 3 Kit Lots ermittelt. Referenz 6 wurde wie erwartet in allen Messungen negativ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Ergebnisse der Präzision des RIDASCREEN® Norovirus ELISA

Referenz Mittelwert / VK		Intra-Assay			Inter-Assay			Inter-Lot
		Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	MW [OD 450/620]	2,295	2,254	2,141	2,090	2,148	2,109	2,116
	VK (%)	5,86%	5,00%	5,75%	13,08%	10,23%	13,40%	12,29%
2	MW [OD 450/620]	1,524	1,617	1,482	1,499	1,574	1,414	1,496
	VK (%)	5,79%	5,48%	4,43%	13,23%	16,24%	18,10%	16,47%
3	MW [OD 450/620]	1,126	1,193	0,738	1,168	1,199	1,189	1,185
	VK (%)	6,19%	6,46%	7,06%	11,77%	13,61%	20,32%	15,70%

4	MW [OD 450/620]	0,578	0,655	0,577	0,649	0,666	0,586	0,634
	VK (%)	8,46%	5,46%	10,09%	16,22%	13,16%	19,87%	17,33%
5	MW [OD 450/620]	0,315	0,387	0,335	0,318	0,325	0,301	0,315
	VK (%)	5,80%	7,64%	8,02%	18,82%	17,17%	24,12%	20,07%
6	MW [OD 450/620]	0,009	0,022	0,036	0,019	0,017	0,011	0,016
	VK (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

13.4. Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des RIDASCREEN® Norovirus ELISA wurde mit zwei nativen Stuhlproben (je eine für Genogruppe I und II) bestimmt, deren jeweilige Norovirus Konzentration zuvor sowohl elektronenmikroskopisch (EM) als auch per real-time RT-PCR untersucht wurde. Um für die EM Untersuchung und die PCR eine geeignete Virus Konzentration zu gewährleisten wurden beide Proben zunächst um 20 % (1:5) vorverdünnt. Aus jeder vorverdünnten Probe wurden 6 weitere Verdünnungen (in 1:10er Stufen) angefertigt. Diese 6 Verdünnungsstufen wurden sowohl mit dem RIDASCREEN® Norovirus ELISA (in Dreifachmessung) als auch mittels EM und real-time RT-PCR untersucht. Aus den mikroskopischen Zählungen und der PCR Messung wurden dann die Konzentrationen der einzelnen Verdünnungen berechnet. Der LoD wird bei derjenigen Konzentration (in RNA Kopien pro Gramm Stuhl (PCR) oder Partikel pro Gramm Stuhl (EM)) festgelegt an dem der ELISA kein positives Ergebnis mehr liefert.

LoD für den RIDASCREEN® Norovirus Test liegt für Genogruppe I (GI) bei $1,51 \times 10^6$ RNA Kopien pro ml Probe ($1,18 \times 10^7$ Partikel pro ml Probe) und für Genogruppe II (GII) bei $1,99 \times 10^6$ RNA Kopien pro ml Probe. Für die letztgenannte Verdünnungsstufe bei GII war die Partikelzahl im Elektronenmikroskop nicht mehr bestimmbar, sondern wurde aus den bis hierhin gemessenen Verdünnungsstufen zurückgerechnet. Dadurch ergab sich ein Wert von $1,22 \times 10^6$ Partikel pro ml Probe für GII (vgl. Tabelle 4 links).

Basierend auf den errechneten LoD Werten pro ml Probe wurde der LoD auch für die Konzentration der Analyten im Reaktionsmix (1:11 Verdünnung der Probe) bestimmt. Dies ergab $1,51 \times 10^5$ RNA Kopien pro ml Reaktionsmix und $1,18 \times 10^6$ Partikel pro ml Reaktionsmix für GI. Für GII wurden $1,99 \times 10^5$ RNA Kopien per ml Reaktionsmix und $1,22 \times 10^5$ Partikel pro ml Reaktionsmix ermittelt (vgl. Tabelle 4 rechts). Alle Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4: LoD des RIDASCREEN® Norovirus

Genogruppe	In Verdünnungsstufe		In Reaktionsmix (1 Teil Probe (aus Verdünnungsstufe) + 10 Teile Diluent 1)	
	real-time RT-PCR [Kopien/ml]	EM [Partikel/ml]	real-time RT-PCR [Kopien/ml]	EM [Partikel/ml]
GGI	$1,51 \times 10^6^*$	$1,18 \times 10^7^*$	$1,51 \times 10^{5**}$	$1,18 \times 10^{6**}$
GGII	$1,99 \times 10^6^*$	$1,22 \times 10^6^*$	$1,99 \times 10^{5**}$	$1,22 \times 10^{5**}$

*Berechnet anhand der letzten Verdünnung mit positivem EM bzw. PCR Ergebnis

**Berechnete Konzentration in Assay-spezifischer Verdünnung in Diluent 1

14. Interferierende Substanzen

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

Bariumsulfat (5 % w/w), Loperamid (Antidiarrhoikum; 5 % w/w), Peptobismol (Antidiarrhoikum; 5 % v/w), Muzin (5 % w/w), Cyclamate (künstlicher Süßstoff 5 % v/w), Humanblut (5 % v/w), Stearinsäure / Palmitinsäure (Mischung 1:1, 40 % w/w), Metronidazol (0,5 %ige Lösung; 5% v/w), Diclofenac (0,00263 % v/w).

Anhang

Testspezifische Symbole :

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

Literatur

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)