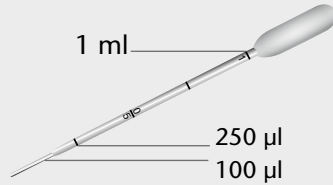
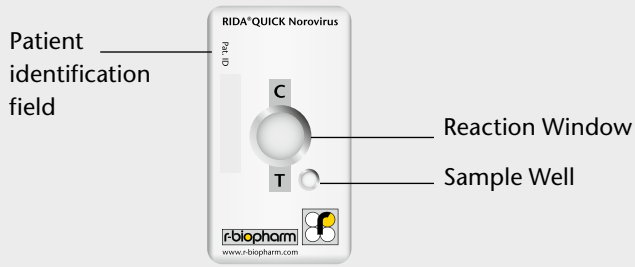


# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)



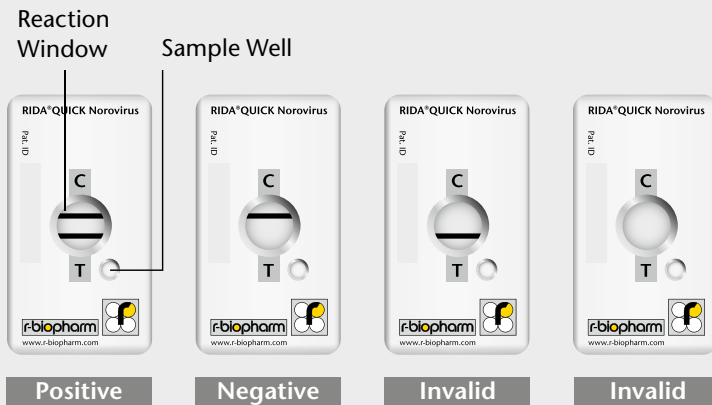
**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Literature**

1. Mead PS, et al. Food- related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:607-625.
2. Glass RJ, et al. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl 2):S254-261.
3. Kaplan JE, et al. An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home: demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases. *Am J Epidemiol* 1982; 116:940-948.
4. Johnston CP, et al. Outbreak management and implications of a nosocomial Norovirus outbreak. *CID* 2007; 45:534-540
5. Corwin AL, et al. Shipboard impact of a probable Norwalk virus outbreak from coastal Japan. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(6):898-903.
6. Evan HS. General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales: 1995 and 1996. *Commun Dis Public Health* 1:165-171.
7. Chan MCW, et al. Fecal viral load and Norovirus associated gastroenteritis. *EID* 2006; 12: No. 8

Italiano

Français

Español

English

Deutsch

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 1. Verwendungszweck

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDA®QUICK Norovirus Test ist ein qualitativer immunchromatografischer Schnelltest zum Nachweis von Noroviren der Genogruppe 1 (GG I) und Genogruppe 2 (GG II) in Stuhlproben. Er dient als Hilfsmittel bei der Diagnose

einer Gastroenteritis und wird verwendet für die Untersuchung von Stuhlproben von Kindern und Erwachsenen, deren Symptome eine Norovirus-bedingte Gastroenteritis vermuten lassen.

## 2. Erläuterung

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).

Der auf monoklonalen Antikörpern aufgebaute RIDA®QUICK Norovirus Test ermöglicht den schnellen und zuverlässigen Nachweis von Norovirus-Antigenen in Stuhlproben und unterstützt damit ein zügiges Management von Patienten. Der Schnelltest ist eine einfache und sensitive Methode, um Antigene der beiden Norovirus-Genogruppen I und II nachzuweisen. Seine Verwendung eignet sich insbesondere bei kleinen Probenserien.

## 3. Testprinzip

Der vorliegende Schnelltest ist ein mehrstufiger immunchromatografischer Membran-Schnelltest, bei dem gegen Noroviren gerichtete spezifische monoklonale Antikörper eingesetzt werden. Die Testkassette verfügt neben dem Probenfenster über ein Reaktionsfenster innerhalb dessen zwei horizontale Linien mit immobilisierten Antikörpern aufgebracht sind. Die Testlinie (T) enthält Antikörper gegen Norovirus-Antigene. Die Kontrolllinie C enthält Anti-Maus-IgG Antikörper. Das Konjugat 1 enthält biotinylierte Antikörper gegen Norovirus-Antigene und das Konjugat 2 besteht aus Streptavidin und daran gebundener Meerrettich-Peroxidase. Zur Testdurchführung wird eine definierte Menge des Überstandes einer zuvor hergestellten Probensuspension mit einer definierten Menge des Konjugates 1 gemischt und in das zweite kleinere Fenster der Testkassette (Probenfenster) einpipettiert. Während einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) wandert das Proben-Konjugatgemisch von dem die










Probe aufnehmenden Filterpad über die Testmembran. Dabei binden in Norovirus-positiven Proben vorliegende Antigen-Konjugat-komplexe an die immobilisierten Anti-Norovirus Antikörper an der Testlinie und die antigenfreien biotinylierten Antikörper binden an der Kontrolllinie. Nach anschließender Zugabe von Konjugat 2 und einer 1-minütigen Inkubationszeit bei RT bindet das mit Peroxidase gekoppelte Streptavidin an das über die spezifischen Antikörper immobilisierte Biotin. Anschließend wird durch Zugabe von Waschpuffer in das Reaktionsfenster nicht gebundenes Peroxidase-Konjugat beseitigt. Bei nachfolgender Zugabe von Substrat entwickelt sich innerhalb 3 Minuten eine blaue Linie an der Testlinie (T) im Falle des Vorliegens einer Norovirus-positiven Probe und eine blaue Linie an der Kontrolllinie (C). Bleibt die blaue Färbung an der Kontrolllinie aus, so zeigt dies einen nicht ordnungsgemäßen Testverlauf und somit ein nicht auswertbares Testergebnis.

## 4. Enthaltene Materialien

Die Reagenzien einer Packung reichen für 20 Bestimmungen

Cassette	20 Best.	20 einzeln verpackte Testkassetten
Diluent	30 ml	Probenverdünnungspuffer, Protein-gepufferte NaCl-Lösung; enthält 0,05 % Kathon CG; gebrauchsfertig; blau gefärbt
Wash	10 ml	Waschpuffer, Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung; gebrauchsfertig
Conjugate 1	7 ml	Biotin-konjugierte Antikörper gegen Noroviren in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; blau gefärbt
Conjugate 2	5 ml	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig;
Substrate	7 ml	Wasserstoffperoxid / TMB; gebrauchsfertig
Pipet	25 Stck.	Beutel mit 25 Einwegpipetten, graduiert

## Erläuterung von Symbolen

 IVD	In-Vitro-Diagnostikum	 REF	Artikel-Nummer
	Gebrauchsanweisung* beachten		Anzahl Tests
 LOT	Chargen-Nummer		Herstelldatum
	verwendbar bis		Hersteller
	Lagertemperatur		

### 5. Benötigte – nicht enthaltene Materialien

- kleine Probenröhrchen für Stuhlsuspension (z.B. Eppendorf-Reaktionsgefäße) mit Rack
- Vortexmischer
- Einweghandschuhe
- Stoppuhr
- Abfallbehälter mit einer 0,5 %igen Natrium-Hypochloritlösung
- Einweg-Impföse oder Einwegspatel für Stuhlprobenentnahme

### 6. 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.
- Der Probenverdünnungspuffer enthält als Konservierungsmittel Kathon CG. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren.
- Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
- Während des Umgangs mit Proben Einmal-Handschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit den Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen genau wie diese mit geeigneten Desinfektionsmitteln (z.B. Natrium-Hypochlorit) behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.
- Die Reagenzien im RIDA®QUICK Norovirus Kit dürfen nicht über das Haltbarkeitsdatum hinaus verwendet werden. Alle Reagenzien sind auf ein optimales Funktionieren eingestellt. Eine Verdünnung oder Veränderung an diesen Reagenzien führt zum Verlust ihrer Funktion. Ebenso führt ein Nichteinhalten der vorgegebenen Zeiten und Temperaturen bei der Testdurchführung zu fehlerhaften Resultaten.
- Reagenzien verschiedener Chargen des RIDA®QUICK Norovirus Kit dürfen nicht gemischt und eingesetzt werden.
- Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien und Proben muss vermieden werden, da es sonst zu fehlerhaften Resultaten kommen kann.
- Für jede Probe muss eine separate Pipette benutzt werden, da sonst Kreuzkontaminationen ebenfalls zu fehlerhaften Resultaten führen.
- Einmal benutzte Kassetten dürfen nicht wieder verwendet werden.

### 7. Haltbarkeit und Lagerung

Die Reagenzien müssen bei 2 – 8 °C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen

werden. Ebenso kann eine Verwendungsfähigkeit von Kassetten dann nicht mehr gewährleistet werden, wenn die Folienverpackung der einzelnen Kassetten so beschädigt ist, dass Feuchtigkeit eindringen konnte.

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 8. Anzeichen für Instabilität oder Reagenzienverfall

Der Test ist nur auszuwerten, wenn die Testkassette vor dem Einpipettieren der Probensuspension unversehrt ist und außer einer schwach rötlichen Einfärbung an der C-Seite keine farbigen Veränderungen oder Banden darauf zu sehen sind. Ferner muss **nach** der Testinkubation mindestens die **blaue** Kontrollbande (C) sichtbar sein. Erscheint diese nicht, sind vor einer Testwiederholung folgende Punkte zu prüfen:

- Haltbarkeit der Testkassetten und des verwendeten Probenverdünnungspuffers
  - Korrekte Testdurchführung
  - Kontamination des Extraktionspuffers
- Ist danach bei Wiederholung des Tests mit einer neuen Testkassette die Kontrollbande wiederum nicht sichtbar, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm Distributeur.

## 9. Sammlung und Handhabung der Proben

Stuhlproben sind in sauberen Behältern ohne irgendwelche Zusätze zu sammeln und vor Testbeginn bei 2 – 8 °C zu lagern. Die Sammlung sollte möglichst bald nach Ausbruch der Symptome (Durchfall, Erbrechen) erfolgen, da die Virusausscheidung 1 – 3 Tage nach Einsatz der Symptome am höchsten ist. Bei einer Lagerung von mehr als 3 Tagen muss die Probe bei – 20 °C eingefroren werden. Eingefrorene Proben sind

vor Testbeginn vollständig aufzutauen und auf Raumtemperatur zu bringen und müssen – ebenso wie frische Proben – vor ihrer Verwendung gut gemischt werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden. Wenn rektale Abstriche eingesetzt werden sollen, ist darauf zu achten, dass genügend Stuhlmaterial (ca. 100 mg) zur Testdurchführung vorhanden ist.

## 10. Vorbereitung der Proben und Reagenzien

Vor Verwendung sind die Proben, der Probenverdünnungspuffer, die Reagenzien sowie die Testkassetten auf Raumtemperatur (20 – 25 °C) zu bringen. Die Testkassetten dürfen erst kurz vor Verwendung

durch Aufreißen der Umverpackung entnommen werden. Einmal entnommene oder benutzte Kassetten dürfen später nicht wiederverwendet werden. Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung ist zu vermeiden.

### 10.1. Herstellung der Probensuspension

In ein gekennzeichnetes Teströhrchen wird 1 ml Probenverdünnungspuffer [Diluent] vorgelegt. Im Falle **flüssiger** Stuhlprobe werden mit der Einwegpipette [Pipet] 100 µl (bis kurz oberhalb der zweiten Verdickung) davon im vorgelegten Probenverdünnungspuffer suspendiert. Bei **fester** Stuhlprobe werden 50 – 100 mg (Volumen einer kleinen Erbse) im Puffer suspendiert.

Anschließend muss die Probe gut homogenisiert werden. Dies erfolgt entweder durch mehrfaches Aufsaugen und Ausstoßen der Suspension mit der Einwegpipette [Pipet] oder alternativ durch Mischen auf einem Vortexmixer. Danach die homogene Suspension mindestens **2 Minuten** sedimentieren lassen.

## 11. Testdurchführung

**Abb. 1:** Darstellung der Testkassette und der Einwegpipette

1. Testkassette [Cassette] der Umverpackung entnehmen und auf eine ebene Unterlage legen.
2. 250 µl vom Überstand der Stuhlsuspension mittels der bereits für diese Probe benutzten Einwegpipette (1. Markierung) entnehmen und in ein gekennzeichnetes sauberes Teströhrchen überführen.
3. Zugabe von 6 Tropfen (Fläschchen senkrecht halten) Konjugat 1 [Conjugate 1]

4. Probe gründlich mischen und komplett mit der Einwegpipette [Pipet] in einem langsamen und gleichmäßigen Fluss in das Probenfenster der Testkassette pipettieren. Die Pipette muss dabei schräg in einem etwa 45°-Winkel mit der Spitze in Richtung Reaktionsfenster geführt werden, damit das Gemisch vollständig auf die Membran im Reaktionsfenster gelangen kann (**Abb.2**).

**Abb. 2:** Pipettenführung beim Einpipettieren der Probe

5. Kassette für **10 Minuten** bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) inkubieren. Es ist darauf zu achten, dass die Membran komplett mit dem Probengemisch durchfeuchtet wird. Andernfalls müssen zusätzlich weitere 100 µl **[Diluent]** in das Probenfenster pipettiert werden.
6. Zugabe von 4 Tropfen (Fläschchen senkrecht halten) Konjugat 2 **[Conjugate|2]** in das Reaktionsfenster und die Kassette für 1 Minute weiter bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Zugabe von 10 Tropfen Waschpuffer **[Wash]** in das Reaktionsfenster und warten bis der Waschpuffer vollständig absorbiert ist.
8. Zugabe von 6 Tropfen (Fläschchen senkrecht halten) Substrat **[Substrate]** in das Reaktionsfenster.
9. Ergebnis innerhalb der folgenden 3 Minuten ablesen. Verfärbungen oder Banden, die erst später als 3 Minuten auftreten, haben keinen diagnostischen Wert.

## 12. Interpretation der Ergebnisse

1. Die Interpretation der Testergebnisse ist am verlässlichsten, wenn die Ablesung der Ergebnisse innerhalb der ersten 3 Minuten nach Substratzugabe bei guter Beleuchtung und einer direkten Sichtlinie abgelesen werden.
2. Prüfen Sie, ob auf der „C“-Seite des Reaktionsfensters eine blaue Linie, die sogenannte interne Kontrolllinie und auf der „T“-Seite ebenfalls eine blaue Linie, die sogenannte Testlinie sichtbar sind. Die Farbintensität der Linien kann schwach bis stark sein.
3. **Positives Ergebnis:** Ein positives Ergebnis kann innerhalb von 3 Minuten nach der Zugabe des Substrates daran erkannt werden, dass beide blaue Linien sichtbar sind (die Testlinie „T“ und die Kontrolllinie „C“). Die Farbintensität kann dabei von schwach bis stark variieren, wobei auch jeweils eine deutliche Teillinie als positives Ergebnis zu interpretieren ist. Andere Membranverfärbungen oder -schatten dürfen hingegen **nicht** als positiv bewertet werden.
4. **Negatives Ergebnis:** Erst nach Ablauf von 3 Minuten kann ein Test als negativ oder ungültig interpretiert werden. Eine einzelne blaue Linie auf der Kontrollseite „C“ des Reaktionsfensters ist sichtbar, aber keine blaue Linie auf der „T“- Seite des Reaktionsfensters. Ein negatives Ergebnis zeigt an, dass entweder kein Norovirus-Antigen in der Probe vorhanden ist, oder die Menge an Antigen so gering ist, dass sie unter die Nachweisgrenze des Tests fällt.
5. **Ungültiges Ergebnis:** Weder auf der Testseite „T“ noch auf der Kontrollseite „C“ des Reaktionsfensters ist eine Linie oder nur eine einzelne Linie auf der „T“-Seite. In beiden Fällen ist der Test ungültig und sollte mit einer neuen Kassette wiederholt werden.

**Abb.3:** Interpretation von Ergebnissen im RIDA®QUICK Norovirus

In der Abbildung 3 sind die verschiedenen Interpretationsmuster dargestellt.

Probenmigration durch die Testmembran stattgefunden hat. Ein farbloser Hintergrund im Ergebnisbereich (Reaktionsfenster) gilt als interne negative Kontrolle. Bei korrekt durchgeführtem Test und ordnungsgemäßer Funktion der Reagenzien ist der Hintergrund farblos, um ein erkennbares Ergebnis zu liefern.

## 13. Qualitätskontrolle

Es dürfen maximal zwei blaue Banden erscheinen. **Fehlt die Kontrollbande (C), ist der Test nicht auswertbar und ungültig!** Die blaue Kontrollbande bestätigt, dass die Probe und die Reagenzien korrekt zugegeben wurden und die Reagenzien während des Testverlaufs aktiv waren und eine korrekte

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 14. Grenzen des Verfahrens

Der RIDA®QUICK Norovirus Test dient dem Nachweis von Noroviren der Genogruppen I und II und bestätigt deren Vorhandensein in Stuhlproben, sofern die Viruslast nicht so gering ist, dass sie unter die Nachweisgrenze des Testsystems fällt. Es ist entscheidend, dass die Stuhlprobe zum Zeitpunkt der symptomatischen Phase von einem an Gastroenteritis erkrankten Patienten gewonnen wird. Die Intensität der Blaufärbung der Testbande sagt nichts über die Stärke der klinischen Symptome aus, sondern ist lediglich ein Indikator für die Virusantigenmenge in der Probe. Sie kann von sehr schwacher Färbung bis hin zu sehr starker Blaufärbung variieren. Ein positives Ergebnis schließt das Vorhandensein von weiteren Krankheitserregern nicht aus. Auch ist das

gleichzeitige Vorhandensein von zwei oder mehreren Erregern in der Probe möglich und kann nur durch Differentialdiagnose geklärt werden. Bei Doppel- und Mehrfachinfektionen können die Symptome stärker sein als bei monokausaler Ursache.

Ein negatives Ergebnis schließt nicht notwendigerweise das Vorhandensein von Noroviren und deren Ursache der Gastroenteritis aus. Gründe hierfür können eine intermittierende Virusausscheidung sein, eine zu geringe Viruslast in der Probe, weil der Zeitpunkt der Probensammlung falsch gewählt wurde, oder ein nicht sachgemäßer Transport sowie falsche Lagerbedingungen der Probe. Bei bestehendem Verdacht auf eine Infektion mit Noroviren muss daher eine neue Probe getestet werden.

## 15. Erwartungswerte

Noroviren gelten mittlerweile weltweit mit etwa 70 % als die häufigste Ursache epidemisch auftretender nicht bakterieller Gastroenteritiden und zu etwa 50 % als Ursache für akute Enteritisausbrüche. Neben ihrem gehäuftem Vorkommen in Gemeinschaftseinrichtungen sind sie auch häufige Ursache sporadisch auftretender Durchfallerkrankungen. Nach Rotaviren sind sie die häufigste Ursache für Gastroenteritiden im Kindesalter, verschonen jedoch nicht die Erwachsenen. Aufgrund der genetischen Variabilität der Noroviren, entwickeln

einmal infizierte Personen keine dauerhafte Immunität, sodass wiederkehrende Infektionen nicht selten sind. Dementsprechend variieren positive Testergebnisse in Abhängigkeit der Prävalenz von Noroviren in einer bestimmten Population sowie von dem dort zirkulierenden Genotyp und dem Umfeld der Patienten. Darüberhinaus haben die Probengewinnung, der Transport und die Lagerung der Probe Einfluss auf die Rate der positiven Testergebnisse.

## 16. Leistungsdaten

In einer Validierungsstudie wurde der RIDA®QUICK Norovirus Test mit insgesamt 113 Stuhlproben untersucht. Die Proben stammten von an Gastroenteritis erkrankten Patienten sowohl aus sporadischen wie aus Ausbruchsgeschehen und wurden in der Wintersaison 2007/2008 im Großraum Hamburg gesammelt und im dortigen Hygieneinstitut jeweils

frisch mittels RT-PCR untersucht und anschließend eingefroren. Im Juli 2008 wurden diese Proben aufgetaut und im gleichen Institut mit dem RIDA®QUICK Norovirus Test und vergleichend mit dem kommerziell verfügbaren RIDASCREEN® Norovirus Elisa getestet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 1** dargestellt.

Tab. 1: Korrelation des RIDA®QUICK Norovirus Schnelltests mit der RT-PCR und RIDASCREEN® Norovirus Elisa

		RIDA®QUICK		RIDASCREEN®	
		Panel WS 2007/8		Panel WS 2007/8	
		+	-	+	-
RT - PCR	+	49	8	43	13
	-	3	53	1	55

<b>Sensitivität:</b>	86,0 %	76,8 %
<b>Spezifität:</b>	94,6 %	98,2 %
<b>PPW:</b>	94,2 %	97,7 %
<b>NPW:</b>	86,9 %	80,9 %
<b>Genauigkeit:</b>	90,3 %	87,5 %



### 16.1 Reproduzierbarkeit

Drei unabhängige Labors testeten je 5 Stuhlproben in einer vierfach-Bestimmung zu 2 unterschiedlichen Zeitpunkten an einem Tag (Intra-assay-Variabilität), sowie an drei unterschiedlichen Tagen (Inter-assay-Variabilität). Die Proben bestanden aus 2 negativen,

2 schwach-positiven und einer mittelstark-positiven Probe.

Der RIDA®QUICK Norovirus Test zeigte eine 100 %ige Reproduzierbarkeit einschließlich der Kontrolllinie.

### 16.2 Kreuzreaktivität

Verschiedene pathogene Keime des Intestinaltraktes wurden mit dem RIDA®QUICK Norovirus Test untersucht und zeigten keine Kreuzreaktivität. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit unverdünnten

Bakteriensuspensionen, die eine Konzentration von 106 bis 109 Organismen pro ml aufwiesen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 2** aufgelistet.

Tab. 2: Testung auf Kreuzreaktionen mit verschiedenen Mikroorganismen

Testkeim	Herkunft	Bezeichnung	Ergebnis	Testkeim	Herkunft	Bezeichnung	Ergebnis
Citrobacter freundii		DSM 30047	negativ	Streptococcus dysgalactiae	Isolat	DSM 20662	negativ
Enterobacter cloacae		DSM 30054	negativ	E. coli (O157:H-)	Isolat		negativ
Enterococcus faecalis		DSM 2570	negativ	E. coli (O116:H21)	Isolat		negativ
Enterococcus faecium		DSM 20477	negativ	E. coli (O111:H-)	Isolat		negativ
E. coli	Isolat		negativ	E. coli (O22:H8)	Isolat		negativ
E. coli	Isolat		negativ	E. coli (O26:H11)	Isolat		negativ
E. hermannii		DSM 4560	negativ	Candida albicans		ATCC 10231	negativ
Lactococcus lactis		DSM 20481	negativ	Salmonella enteritidis		DSM 9898	negativ
Listeria innocua		DSM 20649	negativ	Morganella morganii		DSM 6675	negativ
Proteus mirabilis		DSM 788	negativ	Shigella boydii		DSMZ 7532	negativ
Proteus mirabilis		DSM 4479	negativ	Listeria grayi		DSMZ 20596	negativ
Proteus vulgaris		DSM 30119	negativ	Listeria denitrificans		DSMZ 20603	negativ
Providencia stuartii			negativ	Listeria grayi		DSMZ 20601	negativ
Pseudomonas aeruginosa		DSM 939	negativ	Listeria seelgeri		DSMZ 20751	negativ
Salmonella Agona	Isolat		negativ	Listeria welshimera		DSMZ 20650	negativ
Salmonella Choleraesuis		DSM 4224	negativ	Listeria ivanovii subsp. Ivanovii		DSMZ 20750	negativ
Salmonella Infantis	Isolat		negativ	Listeria monocytogenes SG 1/2a		DSMZ 20600	negativ
Salmonella Ohio	Isolat		negativ	Listeria monocytogenes SG 1		ATCC 19111	negativ
Salmonella Typhimurium	Isolat	DSM 554	negativ	Listeria monocytogenes SG 4b		ATCC 19115	negativ
Staphylococcus aureus		DSM 20372	negativ	Enterobacter sakasaki			negativ
Streptococcus agalactiae	Isolat	DSM 2134	negativ				

### 16.3 Interferierende Substanzen

Die folgenden Substanzen hatten keinen Einfluss auf die Testergebnisse, wenn sie den Stuhlproben in den angegebenen Konzentrationen zugemischt wurden:

- Bariumsulfat (5 % w/w),
- Loperamid (Imodium 5 % w/w),
- Peptobismol (5 % v/w),
- Mucin (5 % w/w),

- Süßstoff (5 % v/w),
- Humanblut (5 % v/w),
- Stearin-/Palmitinsäure (Mix 1:1, 40 % w/w),
- Metronidazol(0,5) Injektionslösung (5 % v/w),
- Diclofenac (0,00263 % v/w).

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 1. Intended Use

For *in vitro* diagnostic use. The RIDA®QUICK Norovirus Test is a quick qualitative immunochromatographic test for determining Genogroup 1 (GG I) and Genogroup 2 (GG II) noroviruses in stool samples. It is used as an aid in the diagnosis of gastroenteritis and for the analysis of

stool samples from children and adults with the symptoms of suspected gastroenteritis caused by the Norovirus.

## 2. Explanation

Noroviruses are a major cause of gastroenteritis worldwide with an estimated 23 million cases a year in the USA (1, 2). They are frequently involved in outbreaks in communal facilities, such as nursing homes, hospitals, day nurseries and prisons, and on cruise ships (3, 4, 5). Outbreaks caused by Noroviruses are reported more often than outbreaks caused by bacterial pathogens and they have a considerable impact on public health (6). The RIDA®QUICK Norovirus Test, which is based on

monoclonal antibodies, makes it possible to determine antigens in stool samples quickly and reliably and therefore speeds up patient management. The quick test is a straightforward, sensitive method for determining the antigens of both Genotypes I and II of the Norovirus. It is particularly suitable for use on small sample series.

## 3. Test principle

This quick test is a multi-step immunochromatographic membrane test which uses specific monoclonal antibodies directed against Noroviruses. Beside the sample well, the test cassette has a reaction window within which two horizontal lines are placed with immobilised antibodies. The test line (T) contains antibodies against Norovirus antigens. The control line C contains anti-mouse IgG antibodies. Conjugate 1 contains biotinylated antibodies against Norovirus antigens and Conjugate 2 consists of streptavidin with horseradish peroxidase bonded to it. For the test procedure, a defined quantity of the supernatant from a pre-prepared sample suspension is mixed with a defined quantity of Conjugate 1 and pipetted into the second smaller window of the test cassette (sample well). During a 10 minute incubation time at room temperature, the sample/conjugate mixture migrates from the filter pad which has absorbed the sample via the test membrane. While doing so, the antigen-conjugate

complexes in Norovirus-positive samples bond to the immobilised anti-Norovirus antibodies on the test line and the biotinylated antibodies with no antigens bond to the control line. After Conjugate 2 has been added and an incubation time of 1 minute at room temperature, the streptavidin attached to the peroxidase bonds to the biotin which has been immobilised via the specific antibodies.










The non-bonded peroxidase is then removed by adding Wash buffer to the reaction window. If the test is Norovirus positive, a blue line appears on the test line (T) within three minutes of adding substrate, along with a blue line on the control line (C). If the control line does not turn blue, this indicates that test has not worked properly and the result cannot be evaluated.

## 4. Materials provided

There are enough reagents in the pack for 20 determinations

Cassette	20 det.	20 single pouched test cassettes
Diluent	30 ml	sample dilution buffer, protein-buffered NaCl solution; contains 0.05 % Kathon CG; ready for use; blue coloured
Wash	10 ml	Wash buffer, phosphate-buffered NaCl solution; ready for use
Conjugate 1	7 ml	Biotin conjugate antibodies against Norovirus in stabilised protein solution; ready for use; coloured blue
Conjugate 2	5 ml	Streptavidin peroxidase conjugate in stabilised protein solution; ready for use
Substrate	7 ml	Hydrogen peroxide/TMB; ready for use
Pipet	25 pieces	Bag containing 25 disposable graduated pipettes

## Explanation of symbols

 IVD	In vitro diagnostic reagent	 REF	Article number
	Follow the instructions		Number of tests
 LOT	Lot number		Date of manufacture
	Expiration date		Manufacturer
	Store at		

## 5. Materials required but not provided

- small test tubes for stool suspensions (e.g. Eppendorf reaction tubes) with rack
- Vortex mixer
- Disposable gloves
- Stop clock
- Waste container containing 0.5 % sodium hypochlorite solution
- Disposable inoculation loops or disposable spatulas for stool sampling

## 6. Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use only.
2. This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories must be followed.
3. The instructions for carrying out the test must be strictly adhered to.
4. The sample dilution buffer contains Kathon CG as a preservative. This substance must not be allowed to come into contact with the skin or mucous membrane.
5. Do not pipette samples or reagents by mouth.
6. Avoid contact with injured skin or mucous membranes.
7. When handling the specimens, wear disposable gloves and when the test is finished, wash your hands.
8. Do not smoke, eat or drink in areas where samples are being used.
9. All reagents and materials which come into contact with potentially infectious samples must be treated with suitable disinfectants (e.g. sodium hypochlorite) in exactly the same way as the samples themselves or autoclaved for at least one hour at 121°C.
10. The reagents in the RIDA®QUICK Norovirus Kit must not be used beyond the use-by date. All the reagents are adjusted for optimum activity. Diluting or changing these reagents will reduce their activity. Not keeping to the specified times and temperatures when carrying out the test will lead to false results.
11. Reagents from different lots of the RIDA®QUICK Norovirus Kit must not be mixed and used.
12. The reagents and samples must be protected from microbial contamination otherwise the results may be compromised.
13. A separate pipette must be used for each sample to prevent cross contamination and false results.
14. Once used, the cassettes must not be used again.

## 7. Stability and storage

The reagents must be stored at 2 – 8°C and must be used before the printed expiry date. After the expiry date, the quality guarantee is no longer valid. Likewise, we cannot guarantee that the cassettes are fit for use if

the foil packaging of the individual cassettes has been damaged so that moisture can penetrate.

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 8. Indications of instability or reagent expiry

The test must only be evaluated if the test cassette is intact **before** the sample suspension is pipetted into it and, except for a weak red colouration on the C side, no colour changes or bands are visible on the membrane. Furthermore, at least the **blue** control band (C) must be visible **after** the test incubation. If this does not appear, the following points must be checked before repeating the test:

- Has the expiry date on the test cassettes or the sample dilution buffer out of date?
- Has the correct test procedure been used?
- Is the extraction buffer contaminated?

If the control band is still not visible after repeating the test with a new test cassette, please contact the manufacturer or your local R-Biopharm distributor.

## 9. Sample collection and handling

Stool samples must be collected in clean containers without any additives and stored at 2 – 8°C before beginning the test. Sampling should take place as soon as possible after the symptoms appear (diarrhoea and vomiting) since virus elimination is at its maximum 1 – 3 days after the onset of the symptoms. If the sample is stored for more than 3 days, it must be frozen at – 20°C. Before starting the test, frozen samples must be

thoroughly thawed, brought to room temperature and (like the fresh samples) must be well mixed before use. Avoid freezing and thawing the specimen repeatedly. If rectal swabs have to be used, make sure that sufficient stool material (approx. 100 mg) is collected to carry out the test.

## 10. Preparation of samples and reagents

Before use, the samples, sample dilution buffer, reagents and test cassettes must be brought to room temperature (20 – 25°C). The test cassettes must only be removed from the external packaging shortly before

they are used. Once the cassettes have been removed from the packaging or used, they must not be used again. The test must not be carried out in direct sunlight.

### 10.1. Preparation of sample suspension

Place 1 ml sample dilution buffer [Diluent] in a labelled test tube. With the **liquid** stool sample, pipette 100 µl (up to just above the second thickening) of the sample with the disposable pipette [Pipet] and suspend it in the sample dilution buffer placed in the tube beforehand. With **solid** stool samples, suspend 50-100 mg (size of a small pea) in the buffer. The sample must then be well

homogenised. This can be achieved either by repeated suction and ejection of the suspension using the disposable pipette [Pipet] or, alternatively, by mixing it on a vortex mixer. After this, leave the homogenised suspension to settle for at least **2 minutes**.

## 11. Test procedure

**Figure 1:** picture of the test cassette and the disposable pipette

1. Remove the test cassette [Cassette] from the external packing and lay it on a level mat.
2. Remove 250 µl of the stool suspension supernatant using the disposable pipette already used for this sample (first mark) and place it in a clean, labelled test tube.
3. Add 6 drops (holding the vial vertically) [Conjugate 1]
4. Thoroughly mix the sample and pipette it complete with a slow steady stream into the sample well of the test cassette using the disposable pipette [Pipet]. Guide the pipette at an angle of approx. 45° with the point towards the reaction window so that the mixture can be placed fully on the membrane of the reaction window (Fig. 2).

**Figure 2:** Pipetting in the sample using the disposable pipette

5. Incubate the cassette for **10 minutes** at room temperature (20 – 25°C). Make sure that the membrane has been thoroughly saturated with the sample mixture. Otherwise, you will need to pipette a further 100 µl **[Diluent]** into the sample well.
6. Add 4 drops (holding the vial vertically) **[Conjugate 2]** to the reaction window and incubate the cassette for 1 more minute at room temperature.
7. Add 10 drops of wash buffer **[Wash]** to the reaction window and wait until the wash buffer is fully absorbed.
8. Add 6 drops (holding the vial vertical) substrate **[Substrate]** to the reaction window.
9. Read off the result within the next 3 minutes. Colourations of bands which appear after three minutes have no diagnostic value.

## 12. Interpretation of results

1. The interpretation of the test results is most reliable when the results are read off within the first 3 minutes of adding the substrate in good light and with a direct line of sight.
2. Check whether a blue line (the so-called internal control line) is visible on the “C” side of the reaction window and whether a blue line (the so-called test line) is also visible on the “T” side of the reaction window. The colour intensity of the lines may vary from weak to strong.
3. **Positive result:** A positive result can be recognised within 3 minutes of adding the substrate by the fact that both blue lines are visible (the test line “T” and the control line “C”). The colour intensity can vary from weak to strong. A clear part-line must be interpreted as positive. Other membrane colourations or shades on the other hand must **not** be interpreted as positive
4. **Negative result:** After 3 minutes have elapsed, a test can be interpreted as negative or not valid.

A single blue line is visible on the control side “C” of the reaction window but no blue line is visible on the test side “T” of the reaction window. A negative result indicates that there are no Norovirus antigens in the sample or the quantity of antigens is so small that it falls below the detection limit of the test.

5. **Result not valid:** There is no line on the test side “T” nor on the control side “C” of the reaction window or there is only a single line on the “T” side. In both cases, the test is invalid and should be repeated with a new cassette. The different interpretation models are illustrated in Figure 3.

**Figure 3:** Interpretation of results from the RIDA®QUICK Norovirus test

## 13. Quality control

Only two bands maximum must appear. **If the control band (C) is missing, the test is invalid and cannot be evaluated!** The blue control band confirms that the sample and the reagents have been added correctly, the reagents were active when the test was carried out and the sample has migrated properly through the test

membrane. A colourless background in the result zone (reaction window) acts as an internal negative control. If the test has been carried out correctly and the reagents have functioned properly, the background will be colourless in order to provide a detectable result.

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 14. Limitations of the method

The RIDA®QUICK Norovirus Test is used to determine Genogroup I and Genogroup II Noroviruses and confirms their presence in stool samples providing the virus loading does not fall below the detection limit of the test system. It is crucial that the stool samples are taken from the patient suffering from gastroenteritis during the phase when they are showing the symptoms. The intensity of the blue colouration of the test band does not reflect the severity of the clinical symptoms but is merely an indication of the quantity of virus antigens in the sample. The blue colouration can vary from weak to very strong.

A positive result does not rule out the presence of other pathogens. The presence of two or more pathogens simultaneously in the sample is also possible and can

only be clarified by differential diagnosis. The symptoms of double and multi-infections may be more severe than those of single causes.

A negative result does not rule out the presence of Noroviruses and their being the cause of the gastroenteritis. This may happen for the following reasons: intermittent virus elimination, the virus loading in the sample is too low, the sample was collected at the wrong time or the transport or storage conditions were not appropriate for the sample. A new sample must therefore be tested when infection with Noroviruses is suspected.

## 15. Expected values

Noroviruses cause 70 % of all non-bacterial gastroenteritis epidemics worldwide and are therefore the most frequent and are responsible for approximately 50 % enteritis outbreaks. As well as their frequent occurrence in communal facilities, they are often the cause of sporadic diarrhoeas. After Rotaviruses, they are the most frequent cause of gastroenteritis in children and affect the adults as well. Since Noroviruses vary genetically, once infected, people are often not permanently immune to re-infection.

Thus, positive test results vary in relation to the prevalence of Noroviruses within a certain population, the genotype circulating there and the environment of the patients. The way the sample was collected, transported and stored also affects the positive test result rate.

## 16. Performance characteristics

In a validation study, RIDA®QUICK Norovirus Test was tested with 113 stool samples. The samples came from patients suffering from gastroenteritis, both from sporadic and outbreak events, and were collected during the winter of 2007/2008 in the metropolitan area of Hamburg, freshly analysed using RT-PCR in the hygiene institute there and then frozen. In July 2008,

the samples were thawed and tested with the RIDA®QUICK Norovirus Test at the same institute along with the commercially available RIDASCREEN® Norovirus Elisa for comparison. The results are shown in **Table 1**.

Table 1: Correlation of the RIDA®QUICK Norovirus quick test with the RT-PCR and RIDASCREEN® Norovirus Elisa

		RIDA®QUICK		RIDASCREEN®	
		Panel WS 2007/8		Panel WS 2007/8	
		+	-	+	-
RT - PCR	+	49	8	43	13
	-	3	53	1	55

<b>Sensitivity:</b>	86.0 %	76.8 %
<b>Specificity:</b>	94.6 %	98.2 %
<b>PPV:</b>	94.2 %	97.7 %
<b>NPV:</b>	86.9 %	80.9 %
<b>Accuracy:</b>	90.3 %	87.5 %

### 16.1 Reproducibility

Three independent laboratories tested 5 stool samples each in a quadruple determination at 2 different times on one day (intra-assay variability) and on three different days (inter-assay variability). Two negative, 2 weakly positive and one medium positive sample were used.

### 16.2 Cross reactivity

Different pathogenic organisms of the intestinal tract were tested using the RIDA®QUICK Norovirus test and showed no cross reactivity. The tests were carried out on undiluted bacterial suspensions with organism

The RIDA®QUICK Norovirus Test showed 100 % reproducibility even for the control line.

concentrations ranging from 106 to 109 organisms per ml. The results are listed in **Table 2**.

Table 2: Testing for cross reactions with different micro-organisms

Test germ	Origin	Name	Result
Citrobacter freundii		DSM 30047	negative
Enterobacter cloacae		DSM 30054	negative
Enterococcus faecalis		DSM 2570	negative
Enterococcus faecium		DSM 20477	negative
E. coli	Isolate		negative
E. coli	Isolate		negative
E. hermannii		DSM 4560	negative
Lactococcus lactis		DSM 20481	negative
Listeria innocua		DSM 20649	negative
Proteus mirabilis		DSM 788	negative
Proteus mirabilis		DSM 4479	negative
Proteus vulgaris		DSM 30119	negative
Providencia stuartii			negative
Pseudomonas aeruginosa		DSM 939	negative
Salmonella Agona	Isolate		negative
Salmonella Choleraesuis		DSM 4224	negative
Salmonella Infantis	Isolate		negative
Salmonella Ohio	Isolate		negative
Salmonella Typhimurium	Isolate	DSM 554	negative
Staphylococcus aureus		DSM 20372	negative
Streptococcus agalactiae	Isolate	DSM 2134	negative

Test germ	Origin	Name	Result
Streptococcus dysgalactiae	Isolate	DSM 20662	negative
E. coli (O157:H-)	Isolate		negative
E. coli (O116:H21)	Isolate		negative
E. coli (O111:H-)	Isolate		negative
E. coli (O22:H8)	Isolate		negative
E. coli (O26:H11)	Isolate		negative
Candida albicans		ATCC 10231	negative
Salmonella enteritidis		DSM 9898	negative
Morganella morganii		DSM 6675	negative
Shigella boydii		DSMZ 7532	negative
Listeria grayi		DSMZ 20596	negative
Listeria denitrificans		DSMZ 20603	negative
Listeria grayi		DSMZ 20601	negative
Listeria seelgeri		DSMZ 20751	negative
Listeria welshimera		DSMZ 20650	negative
Listeria ivanovii subsp. Ivanovii		DSMZ 20750	negative
Listeria monocytogenes SG 1/2a		DSMZ 20600	negative
Listeria monocytogenes SG 1		ATCC 19111	negative
Listeria monocytogenes SG 4b		ATCC 19115	negative
Enterobacter sakasaki			negative

### 16.3 Interfering substances

The following substances had no effect on the test results when they were mixed with the stool samples at the specified concentrations:

- Barium sulphate (5 % w/w),
- Loperamide (immodium 5 % w/w),
- Peptobismol (5 % v/w),
- Mucin (5 % w/w),

- Sweetener (5 % v/w),
- Human blood (5 % v/w),
- Stearic acid/palmitic acid (mixed 1:1, 40 % w/w),
- Metronidazole (0,5) injection solution (5 % v/w),
- Diclofenac (0,00263 % v/w).

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 1. Uso previsto:

Para el diagnóstico *in vitro*. El test rápido RIDA®QUICK Norovirus es un ensayo inmunocromatográfico para la identificación cualitativa de Norovirus del genogrupo 1 (GG I) y genogrupo 2 (GG II) en muestras de heces. Este

ensayo sirve como método de detección para el diagnóstico y se utiliza para los exámenes de muestras de heces de niños y adultos cuyos síntomas permiten suponer una gastroenteritis causada por Norovirus.

## 2. Explicación

Los Norovirus constituyen a escala mundial una causa importante de gastroenteritis con un estimado de 23 millones de infecciones en los EUA (1, 2). Se manifiestan con frecuencia como brotes epidémicos en instituciones sociales como asilos, hospitales, guarderías infantiles, penitenciarías y en barcos de crucero (3, 4, 5). Las epidemias por Norovirus se reportan con mayor frecuencia que los brotes debido a bacterias patógenas y además pueden tener un enorme impacto en la salud pública (6).

El test RIDA®QUICK Norovirus está basado en anticuerpos monoclonales, posibilita la identificación rápida y fiable de los antígenos del Norovirus en muestras de heces y de este modo apoya la gestión en el tratamiento ágil de los pacientes. Este test rápido es un método sencillo y sensible para detectar antígenos de los dos genogrupos I y II de Norovirus. Su uso es apropiado especialmente para el análisis de un número limitado de series de muestras.

## 3. Fundamento del test

El presente test rápido es un ensayo inmunocromatográfico de membrana en varios pasos en el cual se emplean anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra el Norovirus. El casete de análisis posee, junto a la ventana de la muestra, una ventana de reacción dentro de la cual existen dos líneas horizontales donde están absorbidos los anticuerpos inmovilizados. La línea del test (T) contiene anticuerpo contra el antígeno del Norovirus. La línea de control C contiene anticuerpos IgG anti-ratón. El conjugado 1 contiene anticuerpos biotinilados contra los antígenos del Norovirus y el conjugado 2 consiste en peroxidasa de rábano picante unida a estreptavidina. Para la ejecución del test se mezclan cantidades definidas del conjugado 1 y el sobrenadante de la suspensión de la muestra preparada anteriormente y se transfieren con una pipeta a la segunda ventana más pequeña del casete (ventana de la muestra). Durante los 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se produce la migración de la mezcla muestra-conjugado desde la

almohadilla del filtro que absorbe la muestra a la membrana de análisis. En este proceso se lleva a cabo la unión del complejo antígeno-conjugado de las muestras positivas con los anticuerpos inmovilizados contra el Norovirus en la línea del test y por su parte los anticuerpos biotinilados libres de antígeno se enlazan en la línea de control. Tras la adición del conjugado 2 y un tiempo de incubación de 1 minuto a temperatura ambiente se efectúa la unión del complejo estreptavidina-peroxidasa con la biotina inmovilizada por los anticuerpos específicos. A continuación se elimina de la ventana de reacción el conjugado de peroxidasa no enlazado utilizando buffer de lavado. Cuando se adiciona entonces el sustrato, ocurre la formación de una línea azul al cabo de 3 minutos en la línea de análisis (T), en caso de existir una muestra positiva al Norovirus y también una línea azul en la línea de control (C). Si la coloración azul en la línea de control no aparece, esto pone de manifiesto un desarrollo incorrecto del test y se considera como un resultado no evaluable.










## 4. Materiales contenidos en el envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 20 determinaciones

Cassette	20 determ.	20 Casetes de ensayo envasados individualmente
Diluent	30 ml	Buffer de dilución de muestras, solución de NaCl tamponada con buffer de proteína; contiene Kathon CG al 0,05 %; listo para el uso; tinte de azul
Wash	10 ml	Buffer de lavado, solución de NaCl tamponada con buffer de fosfato; listo para el uso
Conjugate 1	7 ml	Anticuerpos conjugados con biotina contra Norovirus en solución estabilizada de proteína; listo para el uso; tinte de azul
Conjugate 2	5 ml	Conjugado estreptavidina-peroxidasa en solución estabilizada de proteína; listo para el uso
Substrate	7 ml	Peróxido de hidrógeno / TMB; listo para el uso
Pipet	25 piezas	Bolsa con 25 pipetas desechables



## Explicación de los símbolos

 IVD	Diagnóstico in-vitro	 REF	Número de producto
	Cumplir con las instrucciones para el uso*		Cantidad de tests
 LOT	Número del lote		Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad		Fabricante
	Temperatura de almacenamiento		

## 5. Materiales necesarios no contenidos en el envase

- Tubos de ensayo pequeños para las suspensiones de heces (por ej. Tubos Eppendorf) con gradilla
- Agitador Vortex
- Guantes desechables
- Cronómetro
- Recipiente de desechos con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %
- Asa de siembra o espátula desechables para la toma de la muestra

## 6. Medidas de seguridad

1. Sólo para el diagnóstico *in vitro*.
2. Este test debe ser realizado solamente por personal calificado de laboratorio. Se deben observar las líneas directivas de trabajo para laboratorios médicos.
3. Las instrucciones para el uso del test deben cumplirse estrictamente.
4. El buffer de dilución de muestras contiene Kathon CG. Se debe evitar, por tanto, el contacto con la piel o mucosas.
5. No pipetear las muestras o los reactivos con la boca.
6. Evitar el contacto con la piel lesionada o las mucosas.
7. Durante el trabajo con las muestras deben usarse guantes desechables y lavar las manos después del test.
8. En los locales donde se trabaje con las muestras no está permitido fumar, comer o beber.
9. Es necesario que todos los materiales y reactivos que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas se sometan a un tratamiento con agentes desinfectantes adecuados (por ej. hipoclorito de sodio) o se esterilicen en autoclave por lo menos durante una hora a 121 °C.
10. Los reactivos en el Kit RIDA®QUICK Norovirus no se deben usar posterior a la fecha de caducidad. Todos los reactivos están preparados para que desarrollen un funcionamiento óptimo. La dilución o modificación de estos reactivos conduce al deterioro de sus funciones. Del mismo modo se pueden producir resultados erróneos si no se cumplen los espacios de tiempos previstos y las temperaturas para la ejecución del test.
11. Los reactivos de distintos lotes del Kit RIDA®QUICK Norovirus no se deben mezclar ni utilizar en el análisis.
12. Se debe evitar la contaminación microbiana de los reactivos y muestras ya que pueden conducir a resultados erróneos.
13. Para cada muestra se debe usar una pipeta diferente a fin de evitar la contaminación cruzada que también conduce a resultados erróneos.
14. Los casetes que se hayan usado una vez no se deben volver a utilizar.

## 7. Durabilidad y almacenamiento

Es indispensable conservar los reactivos entre 2 – 8 °C y se pueden usar hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad no se asumen garantías de calidad. Del mismo modo

tampoco se puede garantizar la capacidad de uso de casetes cuyo envase exterior individual esté tan dañado que pueda penetrar la humedad.

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 8. Indicios de inestabilidad o deterioro de los reactivos

El test sólo debe evaluarse si el casete de ensayo está intacto **antes** de proceder a pipetear la suspensión de la muestra en la ventana, y a excepción de una coloración rojiza leve en el lado C, no se aprecian en las ventanas cambios en el color o bandas. Además, es imprescindible que se observe, **después** de la etapa de incubación del test, por lo menos la banda **azul** de control (C). Si ésta no aparece, se deben hacer las siguientes

comprobaciones antes de repetir el test:

- Fecha de caducidad de los casetes de ensayo y del buffer de dilución de muestras utilizado
- Ejecución correcta del test
- Contaminación del buffer de extracción

Si entonces en la repetición del test con un nuevo casete tampoco es visible la banda de control, usted se debe dirigir al fabricante o a su distribuidor local de R-Biopharm.

## 9. Recolección y conservación de las muestras

Las muestras de heces se deben colectar en recipientes limpios sin ningún tipo de aditivo y conservar entre 2 – 8 °C antes del comienzo del test. La recolección debe realizarse lo antes posible después de la manifestación de los síntomas (diarrea, vómitos), debido a que la mayor excreción de virus se produce en el periodo de 1 – 3 días después de la aparición de los primeros síntomas. Si se conserva por más 3 días, la muestra se debe guardar congelada a –20 °C.

Las muestras guardadas en frío se deben descongelar completamente antes de iniciar el test y adaptar a la temperatura ambiente e igualmente es preciso, como se hace con las muestras frescas, efectuar un buen mezclado de las mismas antes de su uso. Evite congelar y descongelar las muestras varias veces. Si se van a utilizar frotis rectales se debe prestar atención a que haya suficiente material de heces (aprox. 100 mg) para la realización del test.

## 10. Preparación de las muestras y los reactivos

Las muestras, el buffer de dilución y los casetes de ensayo deben adaptarse a la temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de proceder a utilizarlos. Los casetes de ensayo sólo deben abrirse rasgando la envoltura

exterior poco antes de su uso. Los casetes extraídos de su envoltura o que se hayan usado una vez no se deben volver a utilizar. Se debe evitar la incidencia directa de la luz solar durante la realización del test.

### 10.1. Preparación de la suspensión de la muestra

En un tubo de ensayo rotulado se vierte 1 ml de buffer de dilución de muestras [Diluent]. En el caso de una muestra **líquida** de heces se aspiran con una pipeta desechable [Pipet] 100 µl (tomando un poco por encima del segundo espesamiento) y se hace una suspensión en el tubo de ensayo con el buffer de dilución. En el caso de muestras **sólidas** de heces se toman 50 – 100 mg

(volumen de un guisante pequeño) y se suspenden en el buffer. Acto seguido se debe homogeneizar bien la muestra. Esto se efectúa mediante la aspiración y expulsión repetida de la suspensión con la pipeta desechable [Pipet] o alternativamente por agitación en un mezclador Vortex. Se deja reposar la suspensión homogénea al menos durante **2 minutos** para que pueda sedimentar.

## 11. Realización del test

Fig. 1: Imágenes del casete de ensayo y la pipeta desechable

1. Extraer el casete de ensayo [Cassette] de su envoltura exterior y colocar sobre una superficie plana.
2. Aspirar con la pipeta desechable ya usada para esta muestra 250 µl del sobrenadante de la suspensión preparada (primera marca) y transferir a un tubo de ensayo limpio y rotulado.
3. Adicionar 6 gotas (sostener el frasco en posición vertical) de conjugado 1 [Conjugate1]
4. Mezclar la muestra a fondo y aspirar todo el volumen con la pipeta desechable [Pipet] y verterla, despacio pero en un flujo constante, en el casete en su ventana de la muestra. Se sostiene la pipeta en posición inclinada en un ángulo aprox. de 45° con la punta en dirección a la ventana de reacción para que toda la mezcla llegue a la membrana de esta ventana (Fig. 2).

Fig. 2: Dirección de la pipeta con la muestra con respecto al casete

5. Se incuba el casete durante **10 minutos** a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Se debe prestar atención a que la membrana se humedezca a fondo con la muestra. En caso contrario es necesario pipetear adicionalmente otros 100 µl de **[Diluent]** en la ventana de la muestra.
6. Agregar 4 gotas (sostener el frasco en posición vertical) de conjugado 2 **[Conjugate]2** en la ventana de reacción e incubar el casete durante 1 minuto a temperatura ambiente.
7. Se adicionan ahora 10 gotas de buffer de lavado **[Wash]** en la ventana de reacción y se espera hasta que se haya absorbido todo el buffer.
8. Se añaden 6 gotas de sustrato (sostener el frasco en posición vertical) **[Substrate]** en la ventana de reacción.
9. Se puede leer el resultado en el curso de los siguientes 3 minutos. Las coloraciones o bandas que aparecen después de transcurridos 3 minutos se deben evaluar como carentes de valor diagnóstico.

## 12. Interpretación de los resultados

1. La mayor fiabilidad en la evaluación de los análisis se alcanza si se leen los resultados en el transcurso de los primeros 3 minutos posteriores a la adición del sustrato, con buena iluminación y ante la presencia de una línea perfectamente visible.
2. Se recomienda verificar si en el lado “C” de la ventana de reacción aparece una línea azul, denominada línea interna de control, y que en el lado “T” igualmente sea visible una línea azul, llamada la línea del test.  
La intensidad del color de las líneas puede variar entre tenue y más oscuras.
3. **Resultado positivo:** Se reconoce si el resultado es positivo, cuando en el lapso de 3 minutos posteriores a la adición de sustrato, aparecen las dos líneas azules (la línea “T” del test y la línea “C” de control. La intensidad de la coloración puede ir de tenue a oscura, sin embargo, también una sola línea nítida puede ser evaluada como un resultado positivo. Si aparecen otras coloraciones de la membrana o sombras, éstas **no** deben evaluarse como resultado positivo.
4. **Resultado negativo:** Solamente después de transcurridos 3 minutos se debe interpretar el test como negativo o no válido. Aparece solamente la línea azul en el lado de control “C” de la ventana de reacción, pero no existe la línea azul en el lado “T” de la ventana de reacción. Un resultado negativo significa o bien la ausencia de antígenos del Norovirus en la muestra o que la cantidad de antígeno es tan reducida que se encuentra por debajo del límite de detección del test.
5. **Resultado no válido:** No aparece ni en el lado “T” del test ni en el lado “C” de control de la ventana de reacción ninguna línea o únicamente una línea en el lado “T”. En ambos casos se debe considerar el análisis como no válido y repetir el test con un nuevo casete. En la figura 3 se presentan las distintas posibilidades de interpretación de las líneas.

**Fig. 3:** Posibilidades de interpretación de los resultados del test RIDA®QUICK Norovirus

## 13. Control de calidad

Como máximo deben aparecer solamente dos bandas azules. **¡Si no aparece la banda azul de control (C) el test no es evaluable y por tanto inválido!** La banda azul de control confirma que la muestra y los reactivos han sido adicionados correctamente y los reactivos en el curso del test poseen actividad, así como también se ha producido la migración correcta de la muestra a través

de la membrana. Un fondo transparente en el área de los resultados (ventana de reacción) se considera como control negativo interno. Si el test se ejecuta correctamente y los reactivos funcionan bien el fondo debe ser transparente para que se puedan reconocer los resultados.

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 14. Límites del método

El test RIDA®QUICK Norovirus sirve para la identificación de los Norovirus del genogrupo I y II detectando su presencia en muestras de heces, siempre y cuando la carga viral no sea insuficiente y se encuentre por debajo del límite de detección del ensayo. Para el análisis es decisivo que la muestra de heces del paciente que padece la gastroenteritis se obtenga durante la fase sintomática de la enfermedad. La intensidad de la coloración azul de la banda del test no permite hacer conclusiones acerca de la magnitud de los síntomas clínicos, sino que constituye únicamente un indicador de la cantidad de antígenos del virus presentes en la muestra. Su color puede variar desde un azul muy tenue hasta un tono azul muy oscuro.

Un resultado positivo no excluye la presencia de otros

agentes patógenos. Del mismo modo, es posible la presencia simultánea de dos o varios agentes patógenos en la muestra y sólo puede esclarecerse mediante un diagnóstico diferencial. En los casos de infecciones dobles o triples los síntomas pueden ser más fuertes que cuando la causa es un solo patógeno.

Un resultado negativo no excluye necesariamente la presencia de Norovirus y que éstos sean los causantes de una gastroenteritis. Los motivos para esta situación pueden ser una excreción intermitente del virus, una carga viral muy baja en las heces, mala selección del momento de muestreo o el transporte inadecuado y condiciones incorrectas de conservación de la muestra. Si existe la sospecha fundada de una infección por Norovirus, es preciso realizar un test con otra muestra.

## 15. Valores esperados

Los Norovirus son considerados entretanto en el 70 % de los casos como la causa más frecuente de los brotes epidémicos de gastroenteritis no bacteriana en el mundo, así como en aprox. el 50 % de los casos de enteritis aguda. Además de su amplia incidencia en instituciones sociales son también la causa frecuente de enfermedades diarreicas de manifestación esporádica. Después de los Rotavirus son la causa más frecuente de gastroenteritis en la edad infantil, pero no excluyen a los adultos de su ataque. Debido a la variabilidad genética

de los Norovirus las personas que se infectan por primera vez no desarrollan una inmunidad permanente, de modo que las infecciones recurrentes no constituyen un fenómeno raro. En consonancia con este hecho, los resultados positivos varían dependiendo de la prevalencia de los Norovirus en una determinada población y del genotipo circulante, así como del entorno de los pacientes. Además, otros factores como la obtención de la muestra, su transporte y conservación, influyen en los índices de resultados positivos.

## 16. Datos acerca del rendimiento

En un estudio de validación se evaluó el test RIDA®QUICK Norovirus en un total de 113 muestras de heces. Las muestras procedían de pacientes enfermos de gastroenteritis por brotes esporádicos o epidémicos, se recolectaron en la temporada de invierno 2007/2008 en la región de Hamburgo y se analizaron frescas mediante la técnica RT-PCR en el Instituto de Higiene

local y posteriormente se conservaron congeladas en dicho centro. En julio 2008 se procedió a descongelar estas muestras y analizarlas en el propio Instituto con el test RIDA®QUICK Norovirus para llevar a cabo una comparación con el método de ensayo RIDASCREEN® Norovirus ELISA disponible comercialmente. Los resultados se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Correlación del test rápido RIDA®QUICK Norovirus con el RT-PCR y el RIDASCREEN® Norovirus ELISA

		RIDA®QUICK		RIDASCREEN®	
		Evaluación de muestras 2007/8		Evaluación de muestras 2007/8	
		+	-	+	-
RT - PCR	+	49	8	43	13
	-	3	53	1	55

<b>Sensibilidad:</b>	86,0 %	76,8 %
<b>Especificidad:</b>	94,6 %	98,2 %
<b>Valor predictivo positivo:</b>	94,2 %	97,7 %
<b>Valor predictivo negativo:</b>	86,9 %	80,9 %
<b>Exactitud:</b>	90,3 %	87,5 %

### 16.1 16.1 Reproducibilidad

Tres laboratorios independientes evaluaron cada uno 5 muestras de heces en un análisis por cuadruplicado en dos momentos diferentes de un día (variabilidad intra-ensayo), así como en tres días diferentes (variabilidad inter-ensayo). Las muestras se componían de 2 nega-

tivas, 2 débil-positivas y una moderadamente positiva. El test RIDA®QUICK Norovirus demostró un 100 % de reproducibilidad incluyendo la presencia de la línea de control.

### 16.2 Reactividad cruzada

Diferentes gérmenes patógenos del tracto intestinal fueron analizados con el test RIDA®QUICK Norovirus y no presentaron reactividad cruzada. Los exámenes fueron realizados en suspensiones no diluidas de

bacterias con una concentración de 106 hasta 109 microorganismos por ml. Los resultados se resumen en la **tabla 2**.

Tabla 2: Evaluación de la reactividad cruzada entre diferentes microorganismos

Germen de prueba	Origen	Denominación	Resultado	Germen de prueba	Origen	Denominación	Resultado
Citrobacter freundii		DSM 30047	negativo	Streptococcus dysgalactiae	aislamiento	DSM 20662	negativ
Enterobacter cloacae		DSM 30054	negativo	E. coli (O157:H-)	aislamiento		negativ
Enterococcus faecalis		DSM 2570	negativo	E. coli (O116:H21)	aislamiento		negativ
Enterococcus faecium		DSM 20477	negativo	E. coli (O111:H-)	aislamiento		negativ
E. coli	aislamiento		negativo	E. coli (O22:H8)	aislamiento		negativ
E. coli	aislamiento		negativo	E. coli (O26:H11)	aislamiento		negativ
E. hermannii		DSM 4560	negativo	Candida albicans		ATCC 10231	negativo
Lactococcus lactis		DSM 20481	negativo	Salmonella enteritidis		DSM 9898	negativo
Listeria innocua		DSM 20649	negativo	Morganella morganii		DSM 6675	negativo
Proteus mirabilis		DSM 788	negativo	Shigella boydii		DSMZ 7532	negativo
Proteus mirabilis		DSM 4479	negativo	Listeria grayi		DSMZ 20596	negativo
Proteus vulgaris		DSM 30119	negativo	Listeria denitrificans		DSMZ 20603	negativo
Providencia stuartii			negativo	Listeria grayi		DSMZ 20601	negativo
Pseudomonas aeruginosa		DSM 939	negativo	Listeria seelgeri		DSMZ 20751	negativo
Salmonella Agona	aislamiento		negativo	Listeria welshimera		DSMZ 20650	negativo
Salmonella Choleraesuis		DSM 4224	negativo	Listeria ivanovii subsp. Ivanovii		DSMZ 20750	negativo
Salmonella Infantis	aislamiento		negativo	Listeria monocytogenes SG 1/2a		DSMZ 20600	negativo
Salmonella Ohio	aislamiento		negativo	Listeria monocytogenes SG 1		ATCC 19111	negativo
Salmonella Typhimurium	aislamiento	DSM 554	negativo	Listeria monocytogenes SG 4b		ATCC 19115	negativo
Staphylococcus aureus		DSM 20372	negativo	Enterobacter sakasaki			negativo
Streptococcus agalactiae	aislamiento	DSM 2134	negativo				

### 16.3 Sustancias que causan interferencia

Las siguientes sustancias no mostraron ningún efecto en los resultados del test cuando fueron añadidas a las muestras de heces en las concentraciones indicadas:

- Sulfato de bario (5 % p/p),
- Loperamida (Immodium 5 % p/p),
- Peptobismol (5 % v/p),
- Mucina (5 % p/p),

- Edulcorante (5 % v/p),
- Sangre humana (5 % v/p),
- Ácido esteárico/palmítico (mezcla 1:1, 40 % p/p),
- Solución inyectable de metronidazol (0,5) (5 % v/p),
- Diclofenaco (0,00263 % v/p).

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 1. But d'utilisation

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA®QUICK Norovirus est un test rapide immunochromatographique qualitatif pour caractériser les Norovirus du génogroupe 1 (GG I) et génogroupe 2 (GG II) dans des échantillons de selle.

Il permet d'aider à diagnostiquer une gastro-entérite et est utilisé pour l'examen des échantillons de selle des enfants et des adultes dont les symptômes laissent supposer une gastro-entérite causée par un Norovirus.

## 2. Explication

Les Norovirus sont une cause significative dans le monde entier des gastro-entérites avec 23 millions de cas annuels estimés aux USA (1, 2). Ils sont souvent en cause lors des épidémies dans des collectivités telles que des maisons de retraite, des hôpitaux, des garderies, des prisons et également sur des bateaux de croisière (3, 4, 5). Les épidémies avec les Norovirus sont souvent rapportées comme étant des épidémies causées par des agents pathogènes bactériens et peuvent exercer une influence

considérable sur la santé publique (6). Le test RIDA®QUICK Norovirus basé sur des anticorps monoclonaux permet de caractériser rapidement et de manière fiable les antigènes des Norovirus dans des échantillons de selle et permet en conséquence une prise en charge rapide des patients. Le test rapide est une méthode simple et sensitive pour caractériser des antigènes des deux génogroupes de Norovirus I et II. Son utilisation convient en particulier avec des petites séries d'échantillons.

## 3. Principe du test

Le présent test rapide est un test rapide à membrane immunochromatographique à plusieurs niveaux, dans lequel des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre les Norovirus sont utilisés. La cassette test dispose à côté de la fenêtre de l'échantillon d'une fenêtre de réaction, au sein de laquelle deux lignes horizontales avec des anticorps immobilisées sont placées. La ligne de test (T) comprend des anticorps contre l'antigène du Norovirus. La ligne de contrôle C contient l'anticorps IgG anti-souris. Le conjugué 1 comprend des anticorps biotinylés contre l'antigène du Norovirus et le conjugué 2 comprend de la streptavidine et la peroxydase du raifort associée. Pour réaliser le test, une quantité définie du liquide formé sur le dessus d'une suspension d'échantillon réalisée au préalable est mélangée avec une quantité définie du conjugué 1 puis est pipetée dans la deuxième fenêtre plus petite de la cassette test (fenêtre d'échantillon). Pendant une durée d'incubation de 10 minutes à température ambiante

(TA), le mélange conjugué-échantillon passe du tampon du filtre absorbant l'échantillon à la membrane test. Ce faisant, les complexes antigène-conjugué présents dans les échantillons positifs au Norovirus se lient aux anticorps anti-Norovirus immobilisés sur la ligne test et les anticorps biotinylés sans antigène se lient sur la ligne de contrôle. Après ajout du conjugué 2 et au bout d'une durée d'incubation de 1 minute à TA, la streptavidine associée à la peroxydase se lie à la biotine immobilisée via les anticorps spécifiques.










Ensuite, en ajoutant le tampon de lavage dans la fenêtre de réaction, le complexe conjugué-peroxydase non lié est éliminé. Puis, en ajoutant le substrat, une ligne bleue se forme en 3 minutes sur la ligne test (T) en cas de présence d'un échantillon positif au Norovirus ainsi qu'une ligne bleue sur la ligne de contrôle (C). Si la coloration bleue n'apparaît pas sur la ligne de contrôle, le test ne s'est pas déroulé correctement et le résultat de ce test ne peut être exploité.

## 4. Matériaux contenus

Les réactifs d'un emballage suffisent à 20 déterminations.

Cassette	20 déterm.	20 cassettes de test sous emballage individuel
Diluent	30 ml	Tampon de dilution de l'échantillon, solution NaCl avec tampon de protéine ; contient 0,05 % de cathon CG ; prêt à l'emploi ; coloration bleue
Wash	10 ml	Tampon de lavage, solution NaCl avec tampon de phosphates ; prêt à l'emploi
Conjugate 1	7 ml	Anticorps conjugués à la biotine contre les Norovirus dans une solution stabilisée de protéines ; prêt à l'emploi ; coloration bleue
Conjugate 2	5 ml	Conjugué peroxydase-streptavidine dans une solution stabilisée de protéines ; prêt à l'emploi
Substrate	7 ml	Peroxyde d'hydrogène/TMB ; prêt à l'emploi
Pipet	25 pcs	Sachet avec 25 pipettes à usage unique, graduées

## Explication des symboles

 IVD	Diagnostic in-vitro	 REF	Numéro d'article
	Respecter la notice d'utilisation*		Nombre de tests
 LOT	Numéro du lot		Date de fabrication
	Utilisable jusqu'au		Fabricant
	Température de stockage		

## 5. Matériaux non contenus mais nécessaires

- Petits tubes à essai pour suspension de selles (par ex. récipients de réaction Eppendorf) avec rack
- Mélangeur Vortex
- Gants à usage unique
- Chronomètre
- Poubelle avec une solution d'hypochlorite au sodium à 0,5 %
- Cillet d'inoculation ou spatule à usage unique pour prélèvement d'échantillon de selle

## 6. Mesures de précaution

1. Uniquement pour le diagnostic *in vitro*.
2. Ce test ne doit être effectué que par un personnel de laboratoire formé. Les directives concernant le travail dans des laboratoires médicaux doivent être respectées.
3. La notice d'utilisation de réalisation du test doit être respectée rigoureusement.
4. Le tampon de dilution de l'échantillon comprend le cathon CG comme agent conservateur. Tout contact avec la peau ou les muqueuses doit être évité.
5. Ne pas pipeter avec la bouche les échantillons ou les réactifs.
6. Eviter tout contact avec une zone cutanée blessée ou les muqueuses.
7. Au cours du maniement avec les échantillons, porter des gants à usage unique et à l'issue du test, se laver les mains.
8. Ne pas fumer, manger ou boire dans les locaux dans lesquels les échantillons sont manipulés.
9. Tous les réactifs et les matériaux, pouvant entrer en contact avec des échantillons potentiellement infectieux, doivent être traités comme ces derniers
- avec des désinfectants adéquats (par ex. hypochlorite de sodium) ou être passés à l'autoclave au minimum pendant une heure à 121° C.
10. Les réactifs dans le kit RIDA®QUICK Norovirus ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption. Tous les réactifs sont configurés pour un fonctionnement optimal. Une dilution ou modification de ces réactifs entraîne une perte de leurs fonctions. De même, un non-respect des durées et températures spécifiées lors de la réalisation du test donne des résultats incorrects.
11. Des réactifs de différents lots du kit RIDA®QUICK Norovirus ne doivent pas être mélangés ni utilisés en même temps.
12. Une contamination microbienne des réactifs et des échantillons doit être évitée, sinon, des résultats incorrects peuvent apparaître.
13. Pour chaque échantillon, une pipette séparée doit être utilisée puisque sinon, des contaminations croisées entraînent également des résultats incorrects.
14. Les cassettes utilisées ne doivent pas être réutilisées.

## 7. Conservabilité et stockage

Les réactifs doivent être entreposés à 2 – 8 °C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Lorsque la date de péremption est atteinte, aucune garantie de qualité ne peut plus être acceptée. L'utilisation possible des cassettes ne peut plus non plus être garantie lorsque le film d'emballage

individuel des cassettes est altéré et que de l'humidité peut pénétrer.

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 8. Signes d'instabilité ou de dénaturation du réactif

Ce test ne peut être exploité que lorsque la cassette de test est intacte **avant** d'être pipetée dans la suspension de l'échantillon et lorsqu'elle ne présente aucune altération de couleur ou aucune bande de couleur, à l'exception d'une faible coloration rougeâtre sur le côté C. De plus, à l'issue de l'incubation test, la bande de contrôle **bleue** (C) doit être au minimum visible. Si celle-ci n'apparaît pas, il convient de contrôler les éléments suivants avant de renouveler le test :

- Conservabilité des cassettes de test et du tampon de dilution de l'échantillon utilisé
- Réalisation correcte du test
- Contamination du tampon d'extraction

Lors du renouvellement du test avec une nouvelle cassette de test, si la bande de contrôle n'est toujours pas visible, il faut vous adresser au fabricant ou à votre distributeur local R-Biopharm.

## 9. Recueil et stockage des échantillons

Les échantillons de selles doivent être collectés dans des récipients propres sans un quelconque additif et doivent être stockés à 2 – 8° C avant le début du test. Le recueil doit être effectué si possible dès l'apparition des symptômes (diarrhée, vomissement) puisque l'élimination du virus est la plus élevée 1 à 3 jours après apparition des symptômes. En cas de stockage de plus de 3 jours, l'échantillon doit être surgelé à –20° C. Les échantillons

surgelés doivent être décongelés entièrement avant le début du test, être amenés à température ambiante puis être bien mélangés avant d'être utilisés, de la même manière que pour les échantillons frais. Il faut éviter de congeler et de décongeler plusieurs fois l'échantillon. Lorsqu'il est nécessaire d'utiliser des frottis rectaux, il faut veiller à disposer d'une quantité nécessaire de selles pour effectuer le test (env. 100 mg).

## 10. Préparation des échantillons et des réactifs

Avant utilisation, les échantillons, le tampon de dilution de l'échantillon, les réactifs et les cassettes de test doivent être amenés à température ambiante (20 – 25° C). Les cassettes de test doivent être retirées juste avant être

d'utilisées de leur emballage en déchirant ce dernier. Les cassettes utilisées ou sorties de leur emballage ne doivent pas être réutilisées. Tout rayonnement direct du soleil au cours de la réalisation du test doit être évité.

### 10.1. Fabrication de la suspension de l'échantillon

Dans un tube à essai marqué, verser 1 ml de tampon de dilution de l'échantillon [Diluent]. Dans le cas d'un échantillon de selles **liquides**, 100 µl sont mis en suspension avec la pipette à usage unique [Pipet] dans le tampon de dilution de l'échantillon préparé (s'arrêter juste au-dessus du deuxième gonflement). En cas d'échantillon de selles **solides**, 50 – 100 mg (volume

d'un petit pois) sont mis en suspension dans le tampon. L'échantillon doit ensuite être bien homogénéisé. Il est nécessaire pour ce faire d'aspirer plusieurs fois et d'expulser la suspension avec la pipette à usage unique [Pipet] ou de la mélanger avec un mélangeur Vortex. Puis laisser sédimenter la suspension homogène pendant **2 minutes** au minimum.

## 11. Réalisation du test

**Fig. 1:** Représentation de la cassette test et de la pipette à usage unique

1. Retirer la cassette test [Cassette] de l'emballage et poser sur une surface plate.
2. Prélever 250 µl du liquide du dessus de la suspension de selle au moyen de la pipette à usage unique déjà utilisée pour cet échantillon (1<sup>er</sup> marquage) et transvaser dans un tube à essai de test propre marqué.
3. Ajout de 6 gouttes du conjugué 1 (maintenir le flacon à la verticale) [Conjugate 1].
4. Mélanger soigneusement l'échantillon et le pipeter entièrement avec la pipette à usage unique [Pipet] avec un débit lent et régulier dans la fenêtre de l'échantillon de la cassette test. La pipette doit être amenée en biais avec un angle env. de 45° de la pointe en direction de la fenêtre de réaction pour que le mélange puisse parvenir complètement sur la membrane dans la fenêtre de réaction (**Fig. 2**).

**Fig. 2:** Positionnement de la pipette pour pipeter l'échantillon



5. Mettre la cassette **10 minutes** en incubation à température ambiante (20 – 25 °C). Il faut veiller à ce que la membrane soit complètement humidifiée par le mélange de l'échantillon. Sinon, 100 µl supplémentaires de [Diluent] doivent être en plus pipetés dans la fenêtre de l'échantillon.
6. Ajout de 4 gouttes de conjugué 2 (maintenir le flacon à la verticale) [Conjugate2] dans la fenêtre de réaction et laisser incuber la cassette pendant 1 minute supplémentaire à température ambiante.
7. Ajout de 10 gouttes de tampon de lavage [Wash] dans la fenêtre de réaction et attendre jusqu'à ce que le tampon de lavage soit entièrement absorbé.
8. Ajout de 6 gouttes de substrat (maintenir le flacon à la verticale) [Substrate] dans la fenêtre de réaction.
9. Relever le résultat au sein des 3 minutes suivantes. Les colorations ou les bandes qui apparaissent au bout des 3 minutes n'ont pas de valeur diagnostique.

## 12. Interprétation des résultats

1. L'interprétation des résultats du test est la plus fiable lorsque les résultats sont relevés dans les 3 premières minutes suivant l'ajout du substrat, sous un bon éclairage et avec une ligne visuelle directe.
2. Contrôler si sur le côté « C » de la fenêtre de réaction, une ligne bleue, la ligne de contrôle interne, et si sur le côté « T », une ligne bleue également, la ligne de test, sont visibles. L'intensité de la coloration des lignes peut varier de faible à importante.
3. **Résultat positif** : Un résultat positif peut être reconnu dans les 3 minutes suivant l'ajout du substrat lorsque les deux lignes bleues sont visibles (la ligne de test « T » et la ligne de contrôle « C »). L'intensité de la coloration peut varier de faible à importante, une ligne de séparation claire devant être aussi interprétée comme résultat positif. Les autres colorations ou ombres de la membrane **ne** doivent **pas** être évaluées comme résultat positif.
4. **Résultat négatif** : Uniquement après écoulement des 3 minutes, un test peut être interprété comme négatif ou non valable. Une seule ligne bleue sur le côté du contrôle « C » de la fenêtre de réaction est visible, mais aucune ligne bleue sur le côté « T » de la fenêtre de réaction. Un résultat négatif signifie soit l'absence d'antigène du Norovirus dans l'échantillon soit une quantité si faible d'antigène qu'elle passe en dessous de la limite de caractérisation du test.
5. **Résultat non valable** : Aucune ligne n'est visible ni sur le côté du test « T » ni sur le côté du contrôle « C » de la fenêtre de réaction ou une seule ligne est visible sur le côté « T ». Dans les deux cas, le test n'est pas valable et doit être renouvelé avec une nouvelle cassette.  
La figure 3 illustre les différents modèles d'interprétation

Fig. 3: *Interprétation des résultats dans le test RIDA®QUICK Norovirus*

## 13. Contrôle de qualité

Au maximum deux bandes bleues doivent apparaître. **Si la bande de contrôle (C) manque, le test ne peut pas être exploité et n'est pas valable !** La bande de contrôle bleue certifiée que l'échantillon et les réactifs ont été correctement ajoutés, que les réactifs étaient actifs pendant le déroulement du test et qu'une migra-

tion correcte de l'échantillon a eu lieu à travers la membrane test. Un fond transparent dans la zone de résultat (fenêtre de réaction) est considéré comme contrôle négatif interne. En cas de test effectué correctement et de fonctionnement conforme des réactifs, le fond est transparent afin de fournir un résultat reconnaissable.

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 14. Limites du procédé

Le test RIDA®QUICK sert à caractériser les Norovirus des génogroupes I et II et à confirmer leur présence dans des échantillons de selle, à condition que la charge du virus soit supérieure à la limite de caractérisation du système du test. Il est essentiel que l'échantillon de selle ait été recueilli au moment de la phase symptomatique sur un patient atteint d'une gastro-entérite. L'intensité de la coloration bleue de la bande test ne fournit aucune indication sur l'intensité des symptômes cliniques mais est uniquement un indicateur de la quantité des antigènes du virus dans l'échantillon. Elle peut varier d'une coloration très faible à une coloration bleue très importante.

Un résultat positif n'exclut pas la présence d'autres agents pathogènes de maladie. De même, la présence

simultanée de deux ou plusieurs agents pathogènes dans l'échantillon est possible et peut être clarifiée uniquement au moyen de diagnostics différentiels. En cas d'infections doubles et multiples, les symptômes peuvent être plus importants qu'en cas de cause unique. Un résultat négatif n'exclut pas nécessairement la présence des Norovirus et de la gastro-entérite ayant été causée par ces derniers. Les raisons de cette absence de caractérisation peuvent être les suivantes : une élimination intermittente du virus, une charge du virus trop faible dans l'échantillon car le moment du recueil a été mal choisi, un transport effectué incorrectement ou de mauvaises conditions de stockage de l'échantillon. En cas de suspicion d'une infection par des Norovirus, un nouvel échantillon doit en conséquence être testé.

## 15. Valeurs escomptées

Dans plus de 70 % des cas env. les Norovirus sont désormais considérés comme étant la cause la plus fréquente des gastro-entérites non bactériennes survenant de manière épidémique. Ils sont également tenus pour responsable dans 50 % des cas d'épidémies d'entérite aiguës. Outre leur apparition en masse au sein de collectivités, ils sont également la cause fréquente des maladies diarrhéiques survenant de manière sporadique. Derrière les rotavirus, ils sont la cause la plus fréquente des gastro-entérites des enfants mais n'épargnent pas non plus les adultes. En raison de la

variabilité génétique des Norovirus, les personnes ayant déjà été contaminées ne développent pas d'immunité permanente de telle sorte que des infections périodiques ne sont pas rares. En conséquence, les résultats des tests positifs varient selon la prévalence des Norovirus dans une certaine population et également selon le génotype présent dans cette dernière ainsi que selon l'environnement des patients. De plus, le mode de recueil des échantillons, le transport et la stockage des échantillons influencent les taux des échantillons positifs des test.

## 16. Données caractéristiques

Le test RIDA®QUICK Norovirus a été examiné au sein d'une étude de validation avec un total de 113 échantillons de selle. Les échantillons étaient issus de patients atteints de gastro-entérite aussi bien sporadiques que venant de se déclarer. Ils ont été recueillis pendant l'hiver 2007/2008 dans l'agglomération de Hambourg, ont été examinés immédiatement au sein

de l'institut d'hygiène local au moyen de RT-PCR puis ont été congelés. En juillet 2008, ces échantillons ont été décongelés et ont été testés dans le même institut avec le test RIDA®QUICK Norovirus ainsi qu'avec le test RIDASCREEN® Norovirus Elisa disponible dans le commerce afin d'établir une comparaison. Les résultats sont repris dans le **tableau 1**.

Tab. 1: Parallèle entre le test rapide RIDA®QUICK Norovirus et le RT-PCR / le RIDASCREEN® Norovirus Elisa

		RIDA®QUICK		RIDASCREEN®	
		groupe hiver 2007/08		groupe hiver 2007/08	
		+	-	+	-
RT - PCR	+	49	8	43	13
	-	3	53	1	55

<b>Sensitivité :</b>	86,0 %	76,8 %
<b>Spécificité :</b>	94,6 %	98,2 %
<b>PPW :</b>	94,2 %	97,7 %
<b>NPW :</b>	86,9 %	80,9 %
<b>Exactitude :</b>	90,3 %	87,5 %

### 16.1 Reproductibilité

Trois laboratoires indépendants ont testé chacun 5 échantillons de selle au moyen d'une détermination quadruple avec 2 moments différents sur une journée (variabilité intra-essai), et également sur trois jours différents (variabilité inter-essai). Les échantillons

### 16.2 Réactivité croisée

Différents germes pathogènes du système intestinal ont été examinés avec le test RIDA®QUICK Norovirus et n'ont pas présenté de réactivité croisée. Les examens ont été effectués avec des suspensions de bactéries non

comprenaient 2 échantillons négatifs, 2 faiblement positifs et 1 échantillon moyennement positif.

Le test RIDA®QUICK Norovirus a révélé une reproductibilité à 100 %, ligne de contrôle incluse.

diluées indiquant une concentration de 10<sup>6</sup> à 10<sup>9</sup> d'organismes par ml. Les résultats sont énumérés dans le **tableau 2**.

Tab. 2: Test des réactions croisées avec différents microorganismes

Germe test	Origine	Désignation	Résultat
Citrobacter freundii		DSM 30047	négatif
Enterobacter cloacae		DSM 30054	négatif
Enterococcus faecalis		DSM 2570	négatif
Enterococcus faecium		DSM 20477	négatif
E. coli	Élément isolé		négatif
E. coli	Élément isolé		négatif
E. hermannii		DSM 4560	négatif
Lactococcus lactis		DSM 20481	négatif
Listeria innocua		DSM 20649	négatif
Proteus mirabilis		DSM 788	négatif
Proteus mirabilis		DSM 4479	négatif
Proteus vulgaris		DSM 30119	négatif
Providencia stuartii			négatif
Pseudomonas aeruginosa		DSM 939	négatif
Salmonella Agona	Élément isolé		négatif
Salmonella Choleraesuis		DSM 4224	négatif
Salmonella Infantis	Élément isolé		négatif
Salmonella Ohio	Élément isolé		négatif
Salmonella Typhimurium	Élément isolé	DSM 554	négatif
Staphylococcus aureus		DSM 20372	négatif
Streptococcus agalactiae	Isolat	DSM 2134	négatif

Germe test	Origine	Désignation	Résultat
Streptococcus dysgalactiae	Élément isolé	DSM 20662	négatif
E. coli (O157:H-)	Élément isolé		négatif
E. coli (O116:H21)	Élément isolé		négatif
E. coli (O111:H-)	Élément isolé		négatif
E. coli (O22:H8)	Élément isolé		négatif
E. coli (O26:H11)	Élément isolé		négatif
Candida albicans		ATCC 10231	négatif
Salmonella enteritidis		DSM 9898	négatif
Morganella morganii		DSM 6675	négatif
Shigella boydii		DSMZ 7532	négatif
Listeria grayi		DSMZ 20596	négatif
Listeria denitrificans		DSMZ 20603	négatif
Listeria grayi		DSMZ 20601	négatif
Listeria seelgeri		DSMZ 20751	négatif
Listeria welshimera		DSMZ 20650	négatif
Listeria ivanovii subsp. Ivanovii		DSMZ 20750	négatif
Listeria monocytogenes SG 1/2a		DSMZ 20600	négatif
Listeria monocytogenes SG 1		ATCC 19111	négatif
Listeria monocytogenes SG 4b		ATCC 19115	négatif
Enterobacter sakasaki			négatif

### 16.3 Substances interférentes

Les substances suivantes n'ont pas eu d'influence sur les résultats du test si elles avaient été mélangées aux échantillons de selles avec les concentrations spécifiées :

- Sulfate de baryum (5 % w/w),
- Lopéramide (immodium 5 % w/w),
- Pepto-bismol (5 % v/w),
- Mucine (5 % w/w),

- Saccharine (5 % v/w),
- Sang humain (5 % v/w),
- Acide palmitique/stéarique (Mix 1:1, 40 % w/w),
- Métronidazole (0,5) solution d'injection (5 % v/w),
- Diclofénac (0,00263 % v/w).

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 1. Campo di applicazione

Per diagnostica *in vitro*. Il RIDA®QUICK Norovirus è un test rapido immunocromatografico per la rilevazione qualitativa di norovirus del genogruppo 1 (GG I) e del genogruppo 2 (GG II) in campioni di feci. Trova

impiego nella diagnosi della gastroenterite e viene utilizzato per l'esame di campioni di feci di bambini e adulti, i cui sintomi inducono al sospetto di gastroenterite da norovirus.

## 2. Spiegazione

I norovirus sono una importante causa di gastroenterite su scala mondiale con 23 milioni di casi annui stimati negli USA (1, 2). Tali virus sono spesso coinvolti nelle manifestazioni in luoghi di ritrovo comuni quali istituti di cura, ospedali, micronidi, istituti penitenziari e navi da crociera (3, 4, 5). Le manifestazioni con norovirus vengono spesso descritte come manifestazioni provocate da agenti batterici e possono influire considerevolmente sulla salute pubblica (6). Il test

RIDA®QUICK Norovirus, realizzato con anticorpi monoclonali, consente una rilevazione rapida e attendibile di antigeni di norovirus in campioni di feci, consentendo una rapida gestione dei pazienti. Il test rapido è un metodo semplice e sensibile per la rilevazione di antigeni di norovirus di entrambi i genogruppi I e II. Il test è particolarmente indicato in piccole serie di campioni.

## 3. Principio del test

Il presente test rapido è un test immunocromatografico su membrana plurifase, nel quale vengono impiegati anticorpi specifici monoclonali mirati anti norovirus. Oltre alla finestra per campioni, la cassetta per test dispone di una finestra di reazione all'interno della quale sono alloggiati due linee orizzontali con anticorpi immobilizzati. La linea del test (T) contiene anticorpi anti antigene di norovirus. La linea di controllo C contiene anticorpi anti-IgG di topo. Il coniugato 1 contiene anticorpi biotinilati anti antigene di norovirus e il coniugato 2 è composto da streptavidina e perossidasi di rafano legata. Per l'esecuzione del test, una quantità definita di supernatante di una sospensione di campioni precedentemente prodotta viene mischiata ad una quantità definita di coniugato 1 e viene quindi inserita mediante pipetta nella seconda finestra più piccola della cassetta per test (finestra per campioni). Durante un tempo di incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente (RT) la miscela di campioni e










coniugato si sposta dalla spugna di rilevamento dei campioni del filtro alla membrana del test. In tal modo, i complessi di coniugato-antigene presenti nei campioni positivi per norovirus si legano agli anticorpi anti-norovirus immobilizzati sulla linea del test mentre gli anticorpi biotinilati privi di antigene si legano alla linea di controllo. Con la successiva aggiunta di coniugato 2 e dopo 1 minuto di incubazione a temperatura ambiente, la streptavidina accoppiata alla perossidasi si lega alla biotina immobilizzata sugli anticorpi specifici. Aggiungendo quindi il tampone di lavaggio nella finestra di reazione si elimina il coniugato perossidasi non legato. Con la successiva aggiunta di substrato, entro tre minuti, si sviluppa una linea blu sulla linea del test (T), in caso di presenza di un campione positivo per norovirus, e una linea blu sulla linea di controllo (C). Se non appare la colorazione blu sulla linea di controllo, ciò indica una irregolarità nell'esecuzione del test e pertanto un risultato del test non valutabile.

## 4. Materiale in dotazione

I reagenti di una confezione bastano per 20 determinazioni

Cassetta	20 Det.	20 cassette per test confezionate singolarmente
Diluent	30 ml	Tampone di diluizione dei campioni, soluzione proteica tamponata NaCl; contiene 0,05 % Kathon CG; pronto per l'uso; colorazione in blu
Wash	10 ml	Tampone di lavaggio, soluzione tamponata al fosfato NaCl; pronto per l'uso
Conjugate 1	7 ml	Anticorpi coniugati in biotina anti Norovirus in soluzione proteica stabilizzata; pronto per l'uso; colorazione in blu
Conjugate 2	5 ml	Coniugato streptavidina-perossidasi in soluzione proteica stabilizzata; pronto per l'uso
Substrate	7 ml	Perossido ureico/TMB; pronto per l'uso
Pipetta	25 Pezzi	Busta con 25 pipette monocanale, graduate

## Spiegazione dei simboli

 <b>IVD</b>	Metodo diagnostico in-vitro	 <b>REF</b>	Numero di articolo
	Osservare le istruzioni per l'uso*		Quantità di test
 <b>LOT</b>	Numero di lotto		Data di produzione
	Data di scadenza		Produttore
	Temperatura di deposito		

## 5. Materiali necessari, non in dotazione

- Anse di inoculazione piccole per sospensione fecale (ad es. tubi di reazione Eppendorf) con rack
- Miscelatore Vortex
- Guanti monouso
- Cronometro
- Contenitore di rifiuti con soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5 %
- Ansa di diluizione monocanale o spatola monouso per il prelievo di campioni di feci

## 6. Precauzioni

1. Solo per diagnostica *in vitro*.
2. Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le disposizioni per il lavoro nei laboratori medici.
3. Attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso nell'esecuzione del test.
4. Il tampone di diluizione dei campioni contiene Kathon CG come conservante. Evitare il contatto con la pelle o con le mucose.
5. Non introdurre con la bocca campioni o reagenti mediante pipetta.
6. Evitare il contatto con la cute lesa o con le mucose.
7. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e lavare le mani dopo aver eseguito il test.
8. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.
9. Tutti i reagenti e materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati, esattamente come i campioni, con adeguato disinfettante (ad es. ipoclorito di sodio) o sottoposti a sterilizzazione a vapore per almeno un'ora a 121 C.
10. I reagenti del kit RIDA®QUICK Norovirus non devono essere utilizzati oltre la data di conservazione. Tutti i reagenti sono predisposti per un funzionamento ottimale. La diluizione o alterazione dei reagenti ne determina la perdita di funzionalità. Inoltre, l'inosservanza dei tempi e delle temperature indicati nell'esecuzione del test comporta risultati errati.
11. Non devono essere mischiati o impiegati reagenti di lotti diversi del kit RIDA®QUICK Norovirus.
12. Evitare la contaminazione microbica di reagenti e campioni, in quanto altrimenti possono verificarsi risultati errati.
13. Utilizzare una pipetta a parte per ogni campione, in quanto, altrimenti le contaminazioni incrociate possono causare risultati errati.
14. La cassette usate non possono essere riutilizzate.

## 7. Conservazione e deposito dei campioni

I reagenti devono essere conservati a 2 – 8 °C e sono utilizzabili fino alla data di scadenza stampata. Dopo la data di scadenza, non può essere più fornita alcuna garanzia di qualità. Analogamente, la funzionalità delle cassette non può essere più garantita, se l'imballaggio

con pellicola delle singole cassette è danneggiato al punto tale da lasciar penetrare l'umidità.

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 8. Segni di instabilità o scadenza dei reagenti

Il test deve essere valutato, solo quando la cassetta per test, **prima** della introduzione mediante pipetta della sospensione di campione, è intatta e non siano presenti alcune variazioni o striature cromatiche ad eccezione di una colorazione leggermente rossiccia sul lato C. Inoltre **dopo** l'incubazione del test deve essere visibile almeno la banda di controllo **blu** (C). Qualora quest'ultima non appaia, prima di ripetere il test occorre verificare quanto segue:

- periodo di conservazione delle cassette per test e del tampone di diluizione dei campioni utilizzato
  - corretta esecuzione del test
  - contaminazione del tampone di estrazione
- Qualora dopo la ripetizione del test con una nuova cassetta per test la banda di controllo non sia nuovamente visibile, rivolgersi al produttore o al proprio distributore locale R-Biopharm.

## 9. Raccolta e manipolazione dei campioni

I campioni di feci devono essere raccolti in contenitori puliti senza alcuna aggiunta e devono essere conservati prima dell'inizio del test a 2 – 8 °C. La raccolta dovrebbe avvenire il prima possibile dopo la manifestazione dei sintomi (diarrea, vomito), in quanto la manifestazione del virus raggiunge il picco massimo 1 – 3 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi. In caso di conservazione per più di 3 giorni, il campione deve essere congelato a –20 °C.

I campioni congelati devono essere completamente scongelati prima dell'inizio del test e devono essere portati a temperatura ambiente. Inoltre, analogamente ai campioni freschi, devono essere mescolati accuratamente prima dell'uso. Evitare il ripetuto congelamento e scongelamento del campione. Nell'inserimento dei prelievi rettali, assicurarsi che sia presente una quantità sufficiente di materiale fecale (ca. 100 mg) per l'esecuzione del test.

## 10. Preparazione dei campioni e dei reagenti

Prima dell'utilizzo portare campioni, tampone di diluizione dei campioni, reagenti e cassette per test a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Le cassette per test devono essere rimosse dall'imballaggio con apertura a

strappo solo poco prima dell'utilizzo. Le cassette rimosse dall'imballaggio o usate non possono essere successivamente riutilizzate. Evitare l'esposizione diretta all'irradiazione solare durante l'esecuzione del test.

### 10.1. Produzione della sospensione di campione

Introdurre in una provetta graduata 1 ml di tampone di diluizione dei campioni [Diluent]. In caso di campioni di feci **liquide** sospendere 100 µl di campione con la pipetta monocanale [Pipet] (fino a superare di poco il secondo spessore) nell'apposito tampone di diluizione dei campioni. In caso di campioni di feci **solide** sospendere 50 – 100 mg (del volume di un piccolo

pisello) nel tampone. Quindi omogeneizzare bene il campione. L'omogeneizzazione avviene o per introduzione ed espulsione ripetuta della sospensione mediante la pipetta monocanale [Pipet] o in alternativa miscelando con un miscelatore vortex. Lasciare quindi sedimentare la sospensione omogeneizzata per almeno **2 minuti**.

## 11. Esecuzione del test

**Fig. 1:** Rappresentazione della cassetta per test e della pipetta monocanale

1. Rimuovere la cassetta per test [Cassette] dall'imballaggio e riporla su di una superficie di appoggio piana.
2. Estrarre 250 µl di supernatante della sospensione fecale per mezzo della pipetta monocanale già utilizzata per questi campioni (1a tacca) e trasferirli in una provetta graduata pulita.
3. Aggiungere 6 gocce (tenendo le boccette in posizione verticale) di coniugato 1 [Conjugate1]
4. Mescolare accuratamente i campioni e introdurli completamente mediante la pipetta monocanale [Pipet], con un flusso lento e uniforme, nella finestra per campioni della cassetta per test. La pipetta deve essere tenuta in posizione obliqua ad un angolo di 45° ca. con la punta direzionata verso la finestra di reazione, in modo da favorire il trasferimento completo della miscela sulla membrana nella finestra di reazione (Fig. 2).

**Fig. 2:** Posizionamento della pipetta durante l'inserimento dei campioni

5. Incubare la cassetta per **10 minuti** a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Assicurarsi che la membrana sia completamente imbibita con la miscela di campioni. Altrimenti devono essere aggiunti mediante pipetta ulteriori 100 µl di [Diluent] nella finestra per campioni.
6. Aggiungere 4 gocce (tenendo le boccette in posizione verticale) di coniugato 2 [Conjugate]2 nella finestra di reazione e incubare nuovamente la cassetta a temperatura ambiente per 1 minuto.
7. Aggiungere 10 gocce di tampone di lavaggio [Wash] nella finestra di reazione ed attendere fino al completo assorbimento del tampone di lavaggio.
8. Aggiungere 6 gocce (tenendo le boccette in posizione verticale) di substrato [Substrate] nella finestra di reazione.
9. Leggere il risultato entro i 3 minuti successivi. Colorazioni o strisce che compaiono dopo 3 minuti non hanno alcun valore diagnostico.

## 12. Interpretazione dei risultati

1. L'interpretazione dei risultati del test ha la massima attendibilità, quando la lettura dei risultati avviene entro i primi 3 minuti successivi all'aggiunta del substrato, in buone condizioni di illuminazione e con la lettura diretta della linea di visione.
2. Verificare se sono visibili sul lato "C" della finestra di reazione una linea blu, la cosiddetta linea interna di controllo e, sul lato "T" una linea blu, la cosiddetta linea del test. L'intensità cromatica delle linee può essere da debole a forte.
3. **Risultato positivo:** Il risultato positivo può essere rilevato entro i 3 minuti successivi all'aggiunta del substrato quando sono visibili entrambe le linee blu (la linea del test "T" e la linea di controllo "C"). L'intensità cromatica può variare da debole a forte e anche un'eventuale linea parziale nitida deve essere interpretata come risultato positivo. Altre colorazioni o opacità della membrana **non** devono essere invece considerate come un risultato positivo.
4. **Risultato negativo:** il test può essere interpretato come negativo o non valido solo una volta decorsi i 3 minuti. Una singola linea blu è visibile sul lato di controllo "C" della finestra di reazione, ma non appare alcuna linea blu sul lato "T" della finestra di reazione. Un risultato negativo indica che non è presente antigene di norovirus nel campione o che la quantità di antigene è talmente scarsa da essere inferiore al limite di rilevazione del test.
5. **Risultato non valido:** sul lato del test "T" e sul lato di controllo "C" della finestra di reazione appare una linea oppure è visibile solo una linea singola sul lato "T". In entrambi i casi il test non è valido e deve essere ripetuto con una nuova cassetta. La Figura 3 illustra i diversi esempi di interpretazione.

Fig. 3: Interpretazione dei risultati del RIDA®QUICK Norovirus

## 13. Controllo qualità

Devono apparire al massimo due bande blu. **Se manca la banda di controllo (C), il test non è valutabile e non è valido!** La banda di controllo blu conferma che il campione e i reagenti sono stati aggiunti in modo corretto e che i reagenti, durante l'esecuzione del test, erano attivi ed è avvenuta una corretta migrazione dei

campioni attraverso la membrana del test. Lo sfondo neutro nell'area dei risultati (finestra di reazione) vale come controllo interno negativo. In caso di corretta esecuzione del test e di regolare funzionamento dei reagenti, lo sfondo è neutro per l'identificazione del risultato.

# RIDA®QUICK Norovirus (N 1403)

## 14. Limiti della procedura

Il test RIDA®QUICK Norovirus consente la rilevazione di norovirus dei genogruppi I e II e ne conferma la presenza in campioni di feci, a meno che il carico virale non sia talmente scarso da risultare inferiore al limite di rilevazione del sistema del test. È determinante che il campione di feci venga prelevato durante la fase sintomatica del paziente affetto da gastroenterite. L'intensità della colorazione blu della banda del test non indica l'intensità dei sintomi clinici, ma costituisce solamente un indicatore della quantità di antigene del virus nel campione. Tale intensità può variare da molto debole fino ad una colorazione blu molto forte. Un risultato positivo non esclude la presenza di altri agenti patogeni. È possibile anche che siano presenti nel campione due o più agenti patogeni contemporanea-

mente e tale circostanza può essere accertata solo per mezzo di una diagnosi differenziale. In caso di infezioni doppie e multiple, i sintomi possono essere più forti rispetto alle patologie monocausali.

Il risultato negativo non esclude necessariamente la presenza di norovirus e delle cause della gastroenterite. Ciò può essere dovuto ad una espulsione intermittente di virus, ad un carico virale troppo scarso nel campione, all'errata valutazione del momento del prelevamento del campione, al trasporto inappropriato o a condizioni di conservazione dei campioni inadeguate. In caso di fondato sospetto di infezione da norovirus, deve essere pertanto testato un nuovo campione.

## 15. Valori attesi

I norovirus rappresentano attualmente, con una percentuale del 70 % circa, la causa più frequente di gastroenteriti epidemiche non batteriche e, con il 50 % circa, la causa di manifestazioni enteriche acute. Oltre alla loro frequente incidenza nei luoghi di ritrovo comuni, costituiscono spesso anche causa di affezioni diarroiche a manifestazione sporadica. Dopo i rotavirus, rappresentano inoltre la principale causa di gastroenteriti in età infantile, sebbene non colpiscano gli adulti.

Data la variabilità genetica dei norovirus, i soggetti già infettati non sviluppano un'immunità persistente, al punto tale da rendere frequenti le infezioni ricorrenti. Di conseguenza, i risultati del test positivi variano a seconda della prevalenza di norovirus in una determinata popolazione, nonché in funzione del genotipo in circolazione e dell'ambiente dei pazienti. Inoltre, la raccolta, trasporto e deposito dei campioni influiscono sul tasso di risultati positivi del test.

## 16. Prestazioni del test

Il test RIDA®QUICK Norovirus è stato validato in uno studio testando un totale di 113 campioni di feci. I campioni sono stati prelevati da pazienti affetti da gastroenterite, con episodi sia sporadici sia in corso di manifestazione, e sono stati raccolti nella stagione invernale 2007/2008 nell'agglomerato urbano di Amburgo dove sono stati testati singolarmente,

nell'Istituto di igiene locale, freschi, per mezzo delle tecniche di RT-PCR, per poi essere successivamente congelati. Nel luglio 2008 i campioni sono stati scongelati per essere testati nello stesso istituto con il test RIDA®QUICK Norovirus e in un confronto con il test disponibile in commercio RIDASCREEN® Norovirus Elisa. I risultati sono esposti nella **Tabella 1**.

Tab. 1: Correlazione del test rapido RIDA®QUICK Norovirus con tecniche RT-PCR e con il RIDASCREEN® Norovirus Elisa

		RIDA®QUICK		RIDASCREEN®	
		Panel WS 2007/8		Panel WS 2007/8	
		+	-	+	-
RT - PCR	+	49	8	43	13
	-	3	53	1	55

<b>Sensibilità:</b>	86,0 %	76,8 %
<b>Specificità:</b>	94,6 %	98,2 %
<b>PPW:</b>	94,2 %	97,7 %
<b>NPW:</b>	86,9 %	80,9 %
<b>Precisione:</b>	90,3 %	87,5 %



### 16.1 Riproducibilità

Tre laboratori indipendenti hanno testato 5 campioni di feci ciascuno, in determinazione quadrupla, in 2 momenti diversi dello stesso giorno (variabilità intra-assay) e in tre giorni diversi (variabilità inter-assay). I campioni comprendevano 2 campioni negativi,

### 16.2 Reattività incrociata

Diversi germi patogeni del tratto intestinale sono stati esaminati con il Test RIDA®QUICK Norovirus e non hanno rilevato alcuna reattività incrociata. Sono stati condotti esami con sospensioni batteriche non diluite

2 campioni a bassa positività e un campione a media positività.

Il test RIDA®QUICK Norovirus ha mostrato una riproducibilità del 100 % compresa la linea di controllo.

che presentavano una concentrazione da 105 a 109 di organismi per ml. I risultati sono elencati nella **Tabella 2**.

Tab. 2: Esecuzione del test su reazioni incrociate con diversi microorganismi

Germe testato	Provenienza	Denominazione	Risultato
Citrobacter freundii		DSM 30047	negativo
Enterobacter cloacae		DSM 30054	negativo
Enterococcus faecalis		DSM 2570	negativo
Enterococcus faecium		DSM 20477	negativo
E. coli	Isolato		negativo
E. coli	Isolato		negativo
E. hermannii		DSM 4560	negativo
Lactococcus lactis		DSM 20481	negativo
Listeria innocua		DSM 20649	negativo
Proteus mirabilis		DSM 788	negativo
Proteus mirabilis		DSM 4479	negativo
Proteus vulgaris		DSM 30119	negativo
Providencia stuartii			negativo
Pseudomonas aeruginosa		DSM 939	negativo
Salmonella Agona	Isolato		negativo
Salmonella Choleraesuis		DSM 4224	negativo
Salmonella Infantis	Isolato		negativo
Salmonella Ohio	Isolato		negativo
Salmonella Typhimurium	Isolato	DSM 554	negativo
Staphylococcus aureus		DSM 20372	negativo
Streptococcus agalactiae	Isolato	DSM 2134	negativo

Germe testato	Provenienza	Denominazione	Risultato
Streptococcus dysgalactiae	Isolato	DSM 20662	negativo
E. coli (O157:H-)	Isolato		negativo
E. coli (O116:H21)	Isolato		negativo
E. coli (O111:H-)	Isolato		negativo
E. coli (O22:H8)	Isolato		negativo
E. coli (O26:H11)	Isolato		negativo
Candida albicans		ATCC 10231	negativo
Salmonella enteritidis		DSM 9898	negativo
Morganella morganii		DSM 6675	negativo
Shigella boydii		DSMZ 7532	negativo
Listeria grayi		DSMZ 20596	negativo
Listeria denitrificans		DSMZ 20603	negativo
Listeria grayi		DSMZ 20601	negativo
Listeria seelgeri		DSMZ 20751	negativo
Listeria welshimera		DSMZ 20650	negativo
Listeria ivanovii subsp. Ivanovii		DSMZ 20750	negativo
Listeria monocytogenes SG 1/2a		DSMZ 20600	negativo
Listeria monocytogenes SG 1		ATCC 19111	negativo
Listeria monocytogenes SG 4b		ATCC 19115	negativo
Enterobacter sakasaki			negativo

### 16.3 Sostanze interferenti

Le sostanze di seguito riportate non hanno avuto alcuna influenza sui risultati del test, mischiate ai campioni di feci alle concentrazioni seguenti:

- Solfato di bario (5 % w/w),
- Loperamide (Imodium 5 % w/w),
- Peptobismol (5 % v/w),
- Mucina (5 % w/w),

- Edulcorante (5 % v/w),
- Sangue umano (5 % v/w),
- Stearina acido palmitico (Mix 1:1, 40 % w/w),
- Metronidazolo (0,5) soluzione iniettabile (5 % v/w),
- Diclofenac (0,00263 % v/w).

2008-08-28



**R-Biopharm AG**

Landwehrstr. 54, 64293 Darmstadt, Germany

Telefon: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Telefax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

**r-biopharm**

