# IDEIA Norovirus

REF K604411-2 Σ 96 **DE**

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Norovirus in humanen Fäkalproben.

## 1. ZWECKBESTIMMUNG

Der IDEIA™ Norovirus-Test ist ein qualitativer Enzymimmunoassay für den Nachweis von Noroviren der Genogruppe 1 und der Genogruppe 2 in humanem Stuhl.

## 2. ZUSAMMENFASSUNG

Noroviren, früher als kleine, runde, strukturierte Viren [1,2] (SRSV bezeichnet, sind einzelsträngige RNA-Viren, die als Mitglieder der Familie Caliciviridae[3] klassifiziert werden.

Es wurden zunächst vier Antigen-Typen der SRSV unterschieden[4], neuerdings aber, durch die Anwendung molekularer Verfahren, wurden innerhalb der Gattung Norovirus[5] drei Genogruppen identifiziert. Die Genogruppen 1 und 2 sind mit Infektionen bei Menschen verbunden, während die Genogruppe 3 mit Infektionen bei Rindern und Schweinen in Zusammenhang stehen.

Noroviren sind ein wichtiger kausaler Faktor für Gastroenteritis mit hohen Befallsraten bei Kindern und Erwachsenen[7,8]. Ausbrüche von beträchtlichem Ausmaß kommen in Krankenhäusern[9], bei Kreuzfahrten[10] sowie in Schulen[11] und Pflegeheimen[12] vor. Einige Krankheitsausbrüche wurden durch das Trinken von kontaminiertem Wasser und durch die Einnahme von kontaminierter Nahrung, insbesondere Meeresfrüchten, verursacht. Epidemien von Norovirus in Verbindung mit Virusgastroenteritis (winter vomiting disease) können während der Wintermonate in der westlichen Hemisphäre entstehen, aber sporadische Fälle bzw. Ausbrüche innerhalb geschlossener Gemeinschaften oder über Nahrungsmittel können während des ganzen Jahres vorkommen[13].

Berichten zufolge sind Ausbrüche von Norovirus-Erkrankungen häufiger als bakterielle Gastroenteritiden[14], und sie können schwerwiegende volksgesundheitliche Auswirkungen haben. Infektionen bei Kleinkindern, älteren oder immungeschwächten Patienten können schwere Dehydrierungserscheinungen verursachen. Ausbrüche in Krankenhäusern können den stationären Aufenthalt und die Behandlung von infizierten Kindern verlängern.

Die Labordiagnostik des Norovirus spielt eine wichtige Rolle bei der Krankenbehandlung und im öffentlichen Gesundheitswesen, indem sie die Differentialdiagnose von anderen Arten der Gastroenteritis bietet. Bisher konnte Norovirus nicht einfach in Zellkulturen gezüchtet und auch nicht aus klinischen Proben isoliert werden. Elektronenmikroskopie ist ein traditionelles Hilfsmittel für die Diagnose, sie ist allerdings nur spezialisierten Zentren vorbehalten, da sie mit hohen Kosten verbunden ist und von besonderem Fachkönnen abhängt. Es wurde kürzlich eine Anzahl von laboreigenen Molekularamplifikationsverfahren beschrieben[15], welche aber nicht gut standardisiert sind und deren Leistung von der Anwesenheit der Inhibitorstoffe in der Probe sowie von den verwendeten Primer-Sets beeinflusst wird. Darüber hinaus sind diese Tests in der Anwendung unbequem bzw. deren Preis-Nutzen-Verhältnis bei der routinemäßigen Testung nicht gerechtfertigt ist.

Kürzlich wurden genotyp- und genogruppenspezifische Antikörper[16,17] entwickelt, und es wurde der Nachweis erbracht, dass sie sich für schnelle Enzymimmunoassays[18] eignen. Der IDEIA Norovirus-Test verwendet genogruppen-1- und genogruppen-2-spezifische monoklonale und polyklonale Antikörper in einem Festphasen-Immunoassay für den Schnellnachweis der Norovirus-Genotypen.

## 3. TESTPRINZIP

Der IDEIA Norovirus-Test verwendet eine Kombination spezifischer monoklonaler und polyklonaler Antikörper der beiden Genogruppen: 1 und 2, in einem Enzymimmunoassay des Sandwich-Typs in der Festphase für den Nachweis von Norovirus der Genogruppe 1 und der Genogruppe 2. Mikrokavitäten werden mit einer Mischung von Norovirus-spezifischen monoklonalen Antikörpern der Genogruppe 1 und Genogruppe 2 beschichtet. Die Stuhlsuspension bzw. die Kontrollprobe wird in die Mikrokavität gegeben und gleichzeitig mit einer Norovirus-spezifischen, an Meerrettichperoxidase gekoppelten Mischung aus polyklonalen und monoklonalen Antikörpern der Genogruppe 1 und der Genogruppe 2 inkubiert.

Das in der Probe vorhandene Norovirus-Antigen wird zwischen den Antikörpern in der Festphase und den enzymgekoppelten Antikörpern aufgefangen. Nach 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Mikrokavitäten mit dem Waschpuffer in Arbeitskonzentration gewaschen, um das überschüssige Probenmaterial und die ungebundenen enzymmarkierten Antikörper zu entfernen. Ein Chromogen wird zusätzlich in die Kavitäten gegeben und bei Raumtemperatur 30 Minuten lang inkubiert. Die Anwesenheit der spezifisch enzymmarkierten Antikörper in den Kavitäten bewirkt eine Farbänderung, welche durch Zusatz von Säure gestoppt wird. Eine Farbintensität, die deutlich über dem Hintergrundniveau liegt, weist auf das Vorhandensein des Norovirus-Antigens in der Probe oder in der Kontrolle hin. Der IDEIA Norovirus-Test weist Stämme sowohl der Genogruppe 1 als auch der Genogruppe 2 nach, kann aber nicht zwischen ihnen unterscheiden.

## 4. SYMBOLERKLÄRUNG

Die nachfolgenden Symbole wurden überall in der Produktbeschreibung angewandt:

| | |
|---|---|
| REF | Bestellnummer |
| i | Gebrauchsanweisung beachten |
| Σ N | Für 'N' Bestimmungen ausreichend |
| | Hersteller |
| IVD | *In-Vitro*-Diagnostikum |
| | Verwendbar bis datum |
| LOT | Chargenbezeichnung |
| | Zulässiger Temperaturbereich |
| | Wasser hinzugeben |

## 5. GELIEFERTE REAGENZIEN

Σ 96 – Jeder Satz enthält Material, welches für 96 direkte Proben ausreichend ist. - Die Lagerfähigkeit des Kits ist auf der äußeren Verpackung vermerkt.

### 5.1. IDEIA NOROVIRUS – INHALT

i Gebrauchsanweisung

MICROTITRATION PLATE — 1 Mikrotiterplatte mit 96 Mikrokavitäten mit 12 abbrechbaren Streifen zu je 8 Kavitäten, die mit einer Mischung von für Norovirus-spezifischen monoklonalen Antikörpern der Genogruppen 1 und 2 beschichtet sind. Die Platte befindet sich in einem wieder- verschließbaren Folienbeutel mit Trockenmittel für die nachträgliche Wiederverwendung von nicht benutzten Kavitäten.

Je eine Flasche folgenden Inhalts, falls nicht anders bezeichnet:

SAMPLE DILUENT — 110mL Probenverdünnungslösung: Trisgepufferte physiologische Kochsalzlösung mit einem antimikrobiellen Mittel und rotem Farbstoff;

CONTROL + — 4 x Lyophilisierte Positivkontrollen: von Baculovirus exprimierte virusähnliche Norovirus-Partikeln.

CONJUGATE — 13mL Konjugat: peroxidasemarkierte polyklonale Kaninchen-Antikörper und monoklonale Mausantikörper gegen Norovirus der Genogruppen 1 und 2 in gepufferter Eiweißlösung mit einem antimikrobiellen Mittel und blauem Farbstoff.

CONTROL DILUENT — 10mL Kontrolllösungsmittel: phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung mit einem antimikrobiellen Mittel und grünem Farbstoff.

WASH BUFFER (X25) — 2 x 50mL Waschpuffer (25 fach konzentriert): gepufferte Tris-Kochsalzlösung mit antimikrobiellem Wirkstoff und einem Reinigungsmittel.

SUBSTRATE TMB — 13mL Substrat: stabilisiertes Peroxid 3,3'-,5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in einer verdünnten Pufferlösung. TMB ist laut Berichten nicht karzinogen. Nichtsdestotrotz wird persönliche Schutzausrüstung zwecks Vermeidung direkter Aussetzung empfohlen.

STOP SOLUTION — 12mL Stopplösung: 0,46Mol/l Schwefelsäure.

### 5.2. ANSETZEN, LAGERUNG UND WIEDERVERWENDUNG DER KITBESTANDTEILE

Das Format des IDEIA Norovirus-Kits ermöglicht das Testen von bis 96 Proben. Damit eine optimale Testleistung gewährleistet wird, ist es wichtig bei der Lagerung der nicht verwendeten Kitkomponenten die nachstehenden Anweisungen zu befolgen:

#### 5.2.1 Antikörperbeschichtete Mikrokavitäten - MICROTITRATION PLATE

Den Plattenbeutel durch Anschneiden entlang der Versiegelung öffnen. Die benötigte Anzahl Kavitäten abbrechen und in dem Rahmen platzieren. Alle nicht verwendeten Kavitäten und Streifen in den wiederverschließbaren Beutel zusammen mit der Trockenmaterialplatte geben. Den Beutel sorgfältig wieder verschließen und bei 2-8°C aufbewahren. Die Streifen können nach dem erstmaligen Öffnen bis zu 12 Wochen lang verwendet werden, vorausgesetzt sie werden in der beschriebenen Weise aufbewahrt.

#### 5.2.2 Probenverdünner - SAMPLE DILUENT

Gebrauchsfertig. Nicht verbrauchte Probenverdünnungslösung bei 2-8°C lagern.

**HINWEIS: Probenverdünner wird als Negativkontrolle gebraucht, und eine genügende Menge muss für den Gebrauch mit jedem Durchgang der Proben belassen werden. Beim Gebrauch als Negativkontrolle muss die Probenverdünnungslösung in ein Fläschchen aliquotiert werden, das mit denjenigen identisch ist, die auch für das Ansetzen der Probenverdünnungen verwendet werden, um sicherzustellen, dass die Fläschchen keine interferierenden Substanzen enthalten.**

#### 5.2.3 Positivkontrolle - CONTROL +

Die gewünschte Anzahl lyophilisierter Positivkontrollen mit 1mL Kontrollverdünnungsmittel ansetzen. Den Inhalt durch Umkehren mischen. Nicht gebrauchte Positivkontrollen bei 2-8°C aufbewahren und binnen eines Monats verwenden. Für längere Aufbewahrungsperioden in entsprechenden Aliquots bei –20°C lagern.

#### 5.2.4 Konjugat - CONJUGATE

Gebrauchsfertig. Nicht verbrauchtes Konjugat bei 2-8°C lagern.

#### 5.2.5 Kontrollverdünnungsmittel - CONTROL DILUENT

Gebrauchsfertig. Nicht verbrauchte Kontrollverdünnungslösung bei 2-8°C lagern.

#### 5.2.6 Waschpuffer - WASH BUFFER (X25)

Geliefert als 25-faches Konzentrat. Waschpuffer in Arbeitskonzentration wird durch Zugabe von 24 Teilen frisch entionisierten oder destillierten Wassers zu 1 Teil Pufferkonzentrat angesetzt. **Der Waschpuffer in Arbeitskonzentration muss am Tag der Anwendung angesetzt werden.** Nicht verbrauchtes Konzentrat bei 2-8°C lagern.

**Unverbrauchter Waschpuffer in Arbeitskonzentration darf nicht für spätere Benutzung aufbewahrt werden** (Siehe Abschnitt 8.2.10).

#### 5.2.7 Substrat - SUBSTRATE TMB

Gebrauchsfertig. Nicht verbrauchtes Substrat bei 2-8°C lagern, lichtgeschützt aufbewahren.

#### 5.2.8 Stopplösung - STOP SOLUTION

Gebrauchsfertig. Nicht verbrauchte Stopplösung bei 2-8°C lagern.

## 6. ZUSÄTZLICHE REAGENZIEN UND ZUBEHÖR

### 6.1. REAGENZIEN

Frisch entionisiertes oder destilliertes Wasser zum Ansetzen des Waschpuffers in Arbeits-konzentration.

## 7. GERÄTE

Folgendes Zubehör ist notwendig:

Geeignete Behälter für die Gewinnung von Stuhlproben;

Saubere Einwegbehälter mit Schraubverschluss (Minimalinhalt 3mL) für die Vorbereitung von Stuhlsuspensionen;

Sauberes Probenröhrchen für Negativkontrolle;

Sauberes saugfähiges Papier (zum Ausklopfen der Mikrokavitäten);

Präzisionsmikropipetten und Einwegspitzen für 100µL und 1000µL (optional);

Ein Behälter für die Entsorgung mit einem geeigneten frischen Desinfektionsmittel;

Automatische Plattenwaschanlage (optional) oder geeignetes Zubehör für das Waschen von 8 Mikrokavitäten-Streifen

(Abschnitt 10.2.4).

**HINWEIS: Falls weniger als 8 Mikrokavitäten in einem Streifen in einer automatischen Waschanlage mit einem 8-Mikrokavitäten-Kopf gewaschen werden sollen, ist es wichtig die Streifen mit leeren Mikrokavitäten zu füllen.**

Spektrofotometer oder EIA-Plattenlesegerät, welche imstande sind, eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten mit 8-Kavitätenstreifen bei 450nm Extinktion und einer Referenzwellenlänge von 620–650nm abzulesen. (Wahlweise, siehe Abschnitt 10.3, Lesen der Testergebnisse.)

Mikroplatten-Mixer.

Anwendungsmerkblätter für den Gebrauch mit automatischen offenen Systemen sind für dieses Assayverfahren erhältlich. Wenden Sie sich bitte an Ihre lokale Oxoid-Niederlassung oder an Ihren Händler.

## 8. VORSICHTSMASSNAHMEN

**IVD** - Zur Verwendung für *In-vitro*-Untersuchungen. Personen, die einen Test mit dem vorliegenden Produkt durchführen, müssen mit seiner Anwendung vertraut sowie in Laborprozeduren bewandert sein.

### 8.1. SICHERHEITSMASSNAHMEN

8.1.1 Die Stopplösung enthält Schwefelsäure (0,46mol/L). Kontakt mit der Haut und mit Schleimhäuten vermeiden. Falls die Stopplösung in Kontakt mit diesen Stellen kommt, sofort mit Wasser spülen.

8.1.2 Am Arbeitsplatz sind Essen, Trinken, Rauchen, Zubereiten von Speisen sowie die Verwendung von Kosmetika untersagt.

8.1.3 Nicht mit dem Mund pipettieren.

8.1.4 Beim Behandeln klinischer Proben und Reagenzien Einmalhandschuhe tragen. Nach der Arbeit mit potenziell infektiösen Materialien immer die Hände waschen.

8.1.5 Proben, Positivkontrollen und jegliche Materialien, die mit ihnen in Kontakt kommen, müssen als infektiös behandelt und dementsprechend entsorgt werden.

8.1.6 Alle klinischen Proben gemäß der lokalen Gesetzgebung entsorgen.

8.1.7 IDEIA Norovirus-Reagenzien enthalten ein markeneigenes antimikrobielles Mittel, welches für den Benutzer nicht gefährlich ist, falls die üblichen Sicherheitsvorschriften für Laborarbeit befolgt werden.

8.1.8 Das TMB-Substrat enthält 1-Methyl-Pyrrolidon (NMP) in einer Konzentration von >5 % und <10 %, das entsprechend den anwendbaren Richtlinien der Wirtschaftsgemeinschaft (EWG) als reproduktionsschädigend eingestuft ist. Kat. 2. Nachfolgend sind die entsprechenden Risiko- (R-) und Sicherheits-(S-)Sätze aufgeführt.

R61 Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

S53 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen

S45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)

### 8.2. TECHNISCHE SICHERHEITS

8.2.1 Bestandteile nicht nach dem auf den Etiketten angegebenen Verfallsdatum verwenden. Verschiedene Chargen/Reagenzienkits nicht gegeneinander austauschen.

8.2.2 Die Reagenzien liegen in fixen Konzentrationen vor. Falls die Reagenzien geändert oder unter unterschiedlichen Bedingungen als den im Abschnitt 5.2 beschriebenen gelagert werden, wird die Testleistung dadurch beeinflusst.

8.2.3 Die Kontamination der Reagenzien vermeiden.

8.2.4 Für jede Probe, Kontrolle bzw. jedes Reagenz eine neue Einwegpipette oder neue Einwegspitze verwenden, um eine Kreuzkontamination anderer Proben, Kontrollen bzw. Reagenzien zu vermeiden, da ansonsten falsche Ergebnisse auftreten könnten.

8.2.5 Beim Zugeben von Proben oder enzymmarkierten Antikörpern zu den Kavitäten ist das Berühren der Pipettenspitze mit den Kavitäten-Wänden zu vermeiden.

8.2.6 Die Kontamination mit Metallionen oder mit oxydierenden Substanzen vermeiden.

8.2.7 Substrat, welches vor dem Zugeben in die Kavitäten eine blaue Verfärbung aufweist, darf nicht verwendet werden.

8.2.8 Substrat vor Licht schützen.

8.2.9 Mikrokavitäten nicht wieder verwenden.

8.2.10 Unverbrauchten Waschpuffer in Arbeitskonzentration nicht zur späteren Verwendung aufbewahren. Falls nicht gebraucht, müssen Vorräte an Waschpuffer mit entionisiertem oder destilliertem Wasser gespült und zum Trocknen belassen werden.

8.2.11 Handbetriebene oder automatische Waschvorrichtungen müssen frei von bakterieller Kontamination und richtig kalibriert sein und nach den Anweisungen des Herstellers instand gehalten werden.

## 9. GEWINNUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

### 9.1. PROBENGEWINNUNG

Stuhlproben müssen so bald wie möglich nach dem Auftreten der Symptome gewonnen werden.

Berichten zufolge ist der Höhepunkt der Norovirus-Ausscheidung im Stuhl 25 bis 72 Stunden nach dem Auftreten der Symptome erreicht.

Stuhlproben für die Direkttestung müssen in Behälter gesammelt werden, welche keine Zusatzstoffe, Konservierungsmittel, tierisches Serum, Metallionen, oxydierende Stoffe oder Detergenzien enthalten, da das Vorhandensein solcher Zusätze den IDEIA Norovirus-Test beeinträchtigen könnte.

Proben können 3 Tage lang bei 2–8°C vor der Testung aufbewahrt werden. Für längere Aufbewahrungsperioden die Stuhlproben bei –20°C lagern.

### 9.2. VORBEREITUNG DER STUHLPROBEN

1mL Probenverdünnungslösung in einen geeigneten, etikettierten Behälter geben und daraus eine 10%ige Suspension bzw. Verdünnung der Stuhlprobe durch Zusatz von ungefähr 0,1g festen Stuhls (einer erbsengroßen Portion) oder ungefähr 100µL flüssigen Stuhls zubereiten. Sorgfältig mischen und vor dem Testen 10 Minuten lang stehen lassen.

Alternativ nach der Zubereitung der Proben 5 Minuten lang bei ≥5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugieren.

In IDEIA Norovirus-Probenverdünnungsmittel suspendierte/verdünnte Proben können bei 2–8°C bis zu 3 Tage lang vor der Testung aufbewahrt werden.

## 10. TESTVERFAHREN

**VORDERDURCHFÜHRUNGDERTESTPROZEDURSIEHEABSCHNITT 8.2 BEZÜGLICH DER TECHNISCHEN SICHERHEITSMASSNAHMEN.**

**Vor dem Gebrauch müssen Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15-30°C) gebracht werden.**

### 10.1. VORBEREITUNG DER KONTROLLEN

**Negativkontrolle**

1mL Probenverdünnungslösung in ein Probenröhrchen geben, welches mit denen identisch ist, die für die Verdünnung der Proben dienen.

**Positivkontrolle**

Die Positivkontrolle muss mit 1mL Kontrollverdünnungslösung angesetzt und vor Gebrauch gemischt werden (siehe Abschnitt 5.2.3).

Wenigstens eine Negativ- und eine Positiv-IDEIA-Noroviruskontrolle muss mit jedem Durchgang der getesteten Proben mitgeführt werden (siehe Abschnitt 10.2.1).

### 10.2. ASSAYVERFAHREN

Falls Reagenztropfflaschen verwendet werden, müssen diese senkrecht, mit der Düse ungefähr 5 mm über der Kavität, gehalten werden. Die Flasche sanft drücken und sicherstellen, dass die Tropfen frei in die Kavitäten fallen, ohne die Seiten zu berühren. Eine Kontamination aller Tropfflaschendüsen vermeiden. Proben, Kontrollen und Konjugat müssen mittels Mikropipetten zugefügt werden.

#### 10.2.1 Zugeben der Proben

Die entsprechende Anzahl von Kavitäten dem Kavitäten-Halter zuordnen.

In unterschiedliche Kavitäten je 100µL verdünnte Stuhlprobe/Stuhlüberstand, Negativkontrolle oder Positivkontrolle geben. (Mindestens eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle muss bei jedem Testdurchgang mitgeführt werden.)

**Das Aufrühren oder Testen des Sediments im Probenröhrchen ist zu vermeiden. Bei der Verteilung von Proben muss die Übertragungspipette senkrecht gehalten werden, wobei darauf zu achten ist, dass sich die Spitze unmittelbar über der Kavität befindet und die gesamte Probe ohne Berührung der Kavitätenränder eingegeben wird. Es muss darauf geachtet werden, dass die Proben- und Kontroll-Kavitäten nicht kreuzkontaminiert werden, weil dies zu falschen Ergebnissen führen könnte.**

#### 10.2.2 Zugabe des Konjugats

**HINWEIS: Falls mehrere 8-Kavitäten-Streifen verwendet werden, wird empfohlen eine 8-Kanalpipette zu gebrauchen.**

Nach dem Eingeben aller Proben und Kontrollen in die Kavitäten

100µL Konjugat mit einer Mikropipette in alle Kavitäten geben und sanft mischen.

#### 10.2.3 Erste Inkubation

Alle Kavitäten bei 20-30°C **60 ± 5 Minuten lang** inkubieren.

#### 10.2.4 Waschen der Kavitäten

Die Kavitäten müssen mit einem frisch angesetzten Waschpuffer in Arbeitskonzentration gewaschen werden (siehe Abschnitt 5.2.6).

Die Technik des Waschens ist für die Durchführung des Tests von ausschlaggebender Bedeutung (siehe Abschnitt 8.2.11) und muss so ausgeführt werden, dass ein vollständiges Füllen (mit mindestens **350µL** Waschpuffer in Arbeitskonzentration) und anschließendes Entleeren der Kavitäten gesichert wird.

Es sind fünf Waschzyklen, entweder mittels manueller oder automatischer Waschmethode, notwendig.

**Manuelles Waschen**

Falls manuell gewaschen wird, den Inhalt der Kavitäten aufsaugen oder ausschütteln und unter Verwendung von frisch angesetztem Waschpuffer vollständiges Füllen und Entleeren der Kavitäten sicherstellen. Zwischen den einzelnen Waschschritten den restlichen Waschpuffer durch Ausklopfen der umgedrehten Kavitäten auf einem sauberen saugfähigen Papier ganz entfernen. Ferner kann die Wirksamkeit des manuellen Waschens dadurch gesichert werden, dass der Waschpuffer schräg eingefüllt wird, wodurch in den Kavitäten eine Wirbelwirkung entsteht. Nach dem letzten Waschen muss die Platte umgedreht und auf saugfähigem Papier ausgeklopft werden, um die restlichen Spuren des Waschpuffers zu entfernen.

**Automatisches Waschen**

Die Waschautomaten müssen auf 5 vollständige Waschzyklen programmiert werden. Die Waschautomaten müssen richtig kalibriert werden, um das vollständige Füllen und Entleeren der Kavitäten zwischen jedem Waschschritt zu gewährleisten. Nach dem letzten Waschen muss die Platte umgedreht und auf saugfähigem Papier ausgeklopft werden, um die restlichen Spuren der Waschflüssigkeit zu entfernen.

#### 10.2.5 Zugabe von Substrat

2 Tropfen (oder 100µL) Substrat jeder Kavität zugeben.

#### 10.2.6 Zweite Inkubation

Bei 20-30°C **30 Minuten** lang inkubieren.

Die Kavitäten können nach der zweiten Inkubation **sofort visuell abgelesen werden** (siehe Abschnitt 10.3.1).

#### 10.2.7 Stoppen der Reaktion

2 Tropfen (oder 100µL) Stopplösung jeder Kavität zugeben.

Gründliches Mischen der Kavitäten vor dem Ablesen der Ergebnisse sicherstellen. Das farbige Produkt ist bis 30 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung stabil.

### 10.3. LESEN DER TESTERGEBNISSE

#### 10.3.1 Visuelles Lesen

Die Kavitäten können sofort nach der zweiten Inkubation visuell bewertet werden. Es wird empfohlen alle Kavitäten, deren Farbintensität im Vergleich zur Negativkontrolle schwer zu interpretieren ist, auch fotometrisch nach der Zugabe der Stopplösung abzulesen (siehe Abschnitt 10.3.2).

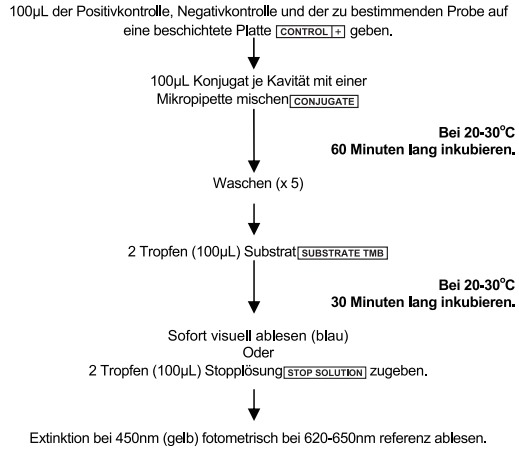
#### 10.3.2 Fotometrisches Lesen

Die Kavitäten müssen innerhalb 30 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung fotometrisch abgelesen werden. Der Inhalt der Kavitäten muss durchgemischt werden und die Extinktion jedes Kavitäten wird mithilfe eines geeigneten Spektrofotometers oder EIA-Plattenlesers bei 450 nm abgelesen. Vor dem Ablesen muss sichergestellt werden, dass die Unterseiten der Kavitäten sauber sind und dass sie kein fremdes Material enthalten. Vor dem Scannen der Platte muss der Leser gegen Luft geblendet werden (d. h., ohne Platte im Halter).

Wahlweise, falls das Spektrofotometer die Anwendung einer Referenz-Wellenlänge (bei 620 bis 650 nm) erlaubt, sollte die Untersuchung bei Doppelwellenlänge erfolgen. Dies schließt eine potenzielle Interferenz aus, welche durch Aberrationen, wie

etwa Staub oder Markierungen an der optischen Oberfläche der Kavitäten, verursacht werden kann.

### 10.4. ZUSAMMENFASSUNG DES IDEIA NOROVIRUS-ASSAY-VERFAHRENS




## 11. INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

### 11.1. NEGATIVKONTROLLE

Wie in Abschnitt 10.1 (Vorbereitung der Kontrollen) erörtert, muss wenigstens eine Negativkontrolle bei jedem Testdurchgang mitgeführt werden.

**Fotometrische Bestimmung**

Der Wert der Negativkontrolle oder der Mittelwert der Negativkontrollen muss weniger als 0,150 Extinktionseinheiten betragen.

### 11.2. CUT-OFF-WERT

**Berechnen des Cut-Off-Wertes**

Der Cut-off-Wert wird errechnet durch Addition von 0,10 Extinktionseinheiten zum Negativkontrollwert (oder dem Mittelwert der Negativkontrollen, falls mehr als eine Negativkontrolle mitgeführt wird).

**Visuelle Bestimmung**

Die Kavität mit der Negativkontrolle darf keine Färbung aufweisen. Ist das nicht der Fall, muss der Test fotometrisch bestimmt oder wiederholt werden.

### 11.3. POSITIVKONTROLLE

Wie in Abschnitt 10.1 (Vorbereitung der Kontrollen) erörtert, muss wenigstens eine Positivkontrolle bei jedem Testdurchgang mitgeführt werden.

**Visuelle Bestimmung**

Die Kavität der Positivkontrolle muss eine deutliche blaue Färbung zeigen, welche sich klar von der Negativkontrolle unterscheidet. Ist dies nicht der Fall, dürfen die Ergebnisse nicht visuell bestimmt werden. Die Ergebnisse müssen fotometrisch bestimmt oder der Test muss wiederholt werden.

**Fotometrische Bestimmung**

Der Wert der Positivkontrolle muss 0,5 Extinktionseinheiten übersteigen.

### 11.4. PROBEN

#### 11.4.1 Visuelle Bestimmung

Jede Probe, deren Blaufärbung stärker als die der Negativkontrolle ist, wird als positiv bewertet, vorausgesetzt, dass die Negativkontrolle farblos ist. Alle Proben, die keine sichtbare Färbung aufweisen, sind als negativ zu bewerten. Falls die Negativkontrolle eine sichtbare Blaufärbung aufweist, müssen alle Ergebnisse nach Zusatz der Stopplösung fotometrisch abgelesen oder der Test muss wiederholt werden.

Falls nach der Zugabe des Substrats der Inhalt einer Kavität dunkelblau wird und einen blauschwarzen Niederschlag bildet, ist die Probe als positiv zu bewerten.

#### 11.4.2 Fotometrische Bestimmung

Jede Probe mit einem Extinktionswert, der größer als der Cut-off-Wert ist, ist positiv (siehe Abschnitt 11.1). Jede Probe mit einem Extinktionswert, der kleiner als der Cut-off-Wert ist, soll als negativ bewertet werden. Ein Ergebnis im Bereich von 0,010 Extinktionseinheit vom Cut-off-Wert wird als nicht ausschlaggebend bewertet, und der Test muss wiederholt oder der Patient nochmals getestet werden.

## 12. LEISTUNGSBESCHRÄNKUNGEN

12.1. Ein negatives Ergebnis schließt die Infektion mit Norovirus bei einem Patienten nicht aus. Einem fehlenden Norovirus-Nachweis können andere Faktoren zugrunde liegen, wie etwa die Probengewinnung zu einem ungeeigneten Zeitpunkt der Erkrankung, wenn noch zu wenig Virionen vorhanden sind, oder unzweckmäßige Gewinnung bzw. Handhabung der Probe.

12.2. Der IDEIA Norovirus-Test weist genogruppenspezifische virale Proteine nach, die in den humanen Genogruppen 1 und 2 des Norovirus vorkommen. Der Test ist aber nicht zur Differenzierung der Norovirus-Serotypen geeignet.

12.3. Die Reagenzien liegen in festen Arbeitskonzentrationen vor. Falls die Reagenzien geändert oder unter unterschiedlichen Bedingungen als den im Abschnitt 5,2 beschriebenen gelagert werden, wird die Testleistung dadurch beeinträchtigt.

12.4. Alle positiven Ergebnisse müssen im Kontext der klinischen Information über den Patienten interpretiert werden. Die Testergebnisse müssen im Kontext der aus epidemiologischen Studien erhältlichen Informationen sowie der klinischen Bewertung des Patienten und aufgrund anderer diagnostischen Verfahren interpretiert werden.

12.5. Mekonium-Proben wurden im Zusammenhang mit dem Gebrauch des IDEIA Norovirus-Tests nicht validiert.

12.6. Der IDEIA Norovirus-Test wurde nicht mit allen bekannten Norovirus-Stämmen validiert, folglich könnte der mangelnde Nachweis des Norovirus durch die Antigen-Unterschiedlichkeit der zirkulierenden Stämme verursacht worden sein.

12.7. Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer Darmpathogene nicht aus. Obwohl der Zusammenhang zwischen Norovirus und Gastroenteritis gut belegt ist, ist es dennoch möglich, dass gleichzeitig auch eine andere mikrobielle Infektion besteht. Es sollten daher auch zusätzliche mikrobiologische Tests parallel zum IDEIA Norovirus-Test durchgeführt werden, um andere mögliche Krankheitsursachen auszuschließen.

## 13. ZU ERWARTENDE WERTE

Die Positivitätsrate kann je nach der Prävalenz des Norovirus in verschiedenen Populationen, entsprechend der geographischen Regionen, zirkulierenden Genotypen, Methoden der Probengewinnung, Bearbeitung, Aufbewahrung, Transport sowie je nach dem allgemeinen gesundheitlichen Umfeld der untersuchten Bevölkerung variieren[7, 13].

Noroviren sind eine häufige Quelle von Krankheitsausbrüchen der Gastroenteritis insbesondere in Krankenhäusern oder Heimen, und sie sind für mehr als 40% der Ausbrüche in Großbritannien verantwortlich[9, 12].

Noroviren sind häufig mit Fällen von Virusgastroenteritis (winter vomiting disease) assoziiert.

## 14. SPEZIFISCHE LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

### 14.1. KLINISCHE STUDIEN

Der verbesserte IDEIA Norovirus-Test wurde mit der früheren Version des Tests (K6043) verglichen. Untersuchungen wurden an Stuhlproben vorgenommen, welche während Norovirus-verdächtigen Gastroenteritis-Ausbrüchen in ganz Großbritannien gewonnen wurden. Alle Proben wurden anfänglich durch PCR getestet. Die Ergebnisse der beiden IDEIA Norovirus-Assays wurden mit dem bekannten PCR-Status der Proben verglichen.

### 14.2. KLINISCHE LEISTUNGSFÄHIGKEIT

Es wurden insgesamt 120 Proben getestet. Darunter waren 83 Proben, welche in der PCR Norovirus-positiv waren und 37 Proben, welche in der PCR negativ auf Norovirus testeten.

Der verbesserte IDEIA Norovirus-Assay ergab größere Sensitivität und besseren negative Vorhersagewert (NPV) im Vergleich zur PCR. Die Spezifität und der positiven Vorhersagewert (PPV) waren gegenüber PCR mit denen der früheren Version des Kits vergleichbar.

**Tabelle 14,2 Testleistung relativ zur PCR des „updated IDEIA Norovirus (K6044)" und der früheren Version „IDEIA Norovirus (K6043)".**

| | Updated IDEIA Norovirus K6044 | Frühere Version IDEIA Norovirus K6043 |
|---|---|---|
| **Sensitivität verglichen mit PCR** | 72,8% (59/81) | 55,4% (46/83) |
| **Spezifität verglichen mit PCR** | 100% (37/37) | 100% (37/37) |
| **PPV** | 100% (59/59) | 100% (46/46) |
| **NPV** | 62,7% (37/59) | 51,4% (83/120) |
| **Nachgewiesene Ausbrüche (Anzahl nachgewiesen durch PCR)** | 16 (21) | 12 (21) |

PPV = Anzahl der echt positiven Proben, die durch den Test richtig erkannt wurden
NPV = Anzahl der echt negativen Proben, die durch den Test richtig erkannt wurden

### 14.3. KREUZREAKTIVITÄT

Die nachfolgenden Mikroorganismen wurden getestet und erwiesen sich im IDEIA Norovirus-Test als negativ. Kreuzreaktivitätsversuche wurden entweder an klinischen Proben mit feststehendem mikrobiellem Status oder an Laborkulturen bekannter Organismen mit ungefähr $10^7$-$10^8$/mL lebensfähigen Organismen durchgeführt. Der Quellennachweis der Mikroorganismen ist aus dem unten aufgeführten Schlüssel ersichtlich:

**Viren**

Adenovirus[a]
Astrovirus[a]
Rotavirus[a]

**Bakterien**

*Acinetobacter sp*
*Aeromonas sp*
*Bacillus sp*
*Campylobacter coli*[a]
*Campylobacter jejuni*[a]
*Citrobacter sp*
*Clostridium perfringens*[a]
*Clostridium difficile*[a]
*Enterobacter sp*
*Escherichia coli*
*Enterococcus faecalis*
*Haemophilus influenzae*
*Helicobacter pylori*
*Klebsiella sp*
*Lactobacillus sp*
*Listeria sp*
*Peptococcus sp*
*Peptostreptococcus sp*
*Proteus sp*
*Pseudomonas sp*
*Salmonella enteritidis*[a]
*Salmonella typhimurium*
*Serratia sp*
*Shigella flexneri*[a]
*Shigella sonnei*
*Staphylococcus aureus*
*Staphylococcus epidermidis*
*Streptococcus group A*
*Veillonella sp*
*Vibrio cholerae*[a]
*Vibrio parahaemolyticus*[a]

**Andere Mikroorganismen**

*Candida albicans*[b]

**Schlüssel:**

[a] Mikroorganismen, die im Stuhl vorkommen und in Stuhlproben getestet wurden

[b] Sowohl in Stuhlproben als auch in Flüssigmedium getestete Mikroorganismen
Alle anderen Mikroorganismen wurden in Bouillonkultur getestet.

## 15. REFERENZEN


1. **Jiang, X., D.Y. Graham, K. Wang, and M.K. Estes. (1990)**
   Norwalk virus genome cloning and characterisation
   Science **250**:1580-1583.
2. **Jiang, X.M. Wang, K. Wang, and M.K. Estes (1993)**
   Sequence and genomic organisation of Norwalk virus.
   Virology **195**:51-61.
3. **Green, K. Y., T. Ando, M.S. Balayan, I.N. Clarke, M.K. Estes, D.O. Matson, S. N Nakata, J.D. Neill, M.J. Studdert, and H.J. Theil**
   Caliciviridae, In M.H. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carsten, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.H. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, and R.B. Wickner (ed.), Virus taxonomy.
   Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, in press.
   Academic Press, Orlando, Fla.
4. **Lewis, D. (1991)**
   Norwalk agent and other small round structured viruses in the U.K.
   J. Infect. **23**:220-222.
5. **Green S.M., K.E. Dingle, P.R. Lambden, E.O. Caul, C.R. Ashley, and I.N. Clarke (1994)**
   Human enteric Calicivirdae; a new prevalent SRSV group defined by RNA-dependent RNA polymerase and capsid diversity.
   J. Gen. Virol. **75**:1883-1888.
6. **Ando T, Noel JS, Fankhauser (2000)**
   RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses."
   J Infect Dis 181(suppl 2):S336—48.
7. **Blacklow, N.R. and H.B. Greenberg. (1990)**
   Viral gastroenteritis.
   N. Engl. J. Med.**325**:252-264.

8. **E. Owen Caul (1996)**

Viral gastroenteritis: Small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses.
Part 1. The clinical and diagnostic perspective.
J Clin Pathol 49; 874:438–42.

9. **Chadwick, P.R., and R. McCann, (1994)**

Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital
outbreak of gastroenteritis.
J. Hosp. Infect. **26**:251-259.

10. **McEvoy, M., W. Balke, D. Brown, J. Green, and R. Cartwright. (1996)**

An outbreak of viral gastroenteritis on a cruise ship.
Commun. Dis. Rep. CDR Rev.**6**:R188-R192.

11. **Kobayashi, S.,T. Morishita, T.Yamashita, K. Sakae, O. Nishio, T. Miyake, Y. Ishihara, and S. Isomura. (1991)**

A large outbreak of gastroenteritis associated with a small round structured virus among schoolchildren and teachers in Japan.
Epidemiol. Infect. **107**:81-86.

12. **Jiang, X., E. Turf, J.Hu, E. Barrett, X.M. Dal, S. Monroe, C. Humphrey, L.K. Pickering, and D.O. Matson. (1996)**

Outbreaks of gastroenteritis in elderly nursing homes and retirement facilities associated with human caliciviruses.
J. Med. Virol. **50**.335-341.

13. **E. Owen Caul (1996)**

Viral gastroenteritis: Small round structured viruses, calciviruses and astroviruses.
Part II. The epidemiological perspective.
J Clin Pathol.**49**:959-964.

14. **H.S Evans, P. Madden, C. Douglas, G.K. Adak, S.J. O'Brien, T. Djuretic, P.G. Wall, R. Stanwell-Smith. (1998)**

General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales: 1995 and 1996.
Commun Dis Public Health **1**:165-71.

15. **Green J. Hale A.D, Brown DWG. (1995)**

Recent developments in the detection and characterisation of small round structured viruses.
PHLS Microbiology Digest:**12**:219-22.

16. **James P. Brinkler, Neil R. Blacklow, Mary K. Estes, Christine L. Moe, Kellogg J. Schwab, and John E. Herrmann. (1998)**

Detection of Norwalk Virus and other genogroup 1 human Caliciviruses by a Monoclonal Antibody, Recombinant-Antigen-Based Immunoglobulin M. Capture Enzyme Immunoassay.
Journal of Clinical, Microbiology.p.1064-1069.

17. **Antony D. Hale, Tomoyuki N. Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Max Ciarlet, XI Jiang, Naokazu Takeda, David W.G. Brown, and M. K. Estes. (2000)**

Identification of an Epitope Common to Genogroup 1 "Norwalk-Like Viruses".
Journal of Clinical Microbiology **-1660** (10):

18. **Vipond IB, Pelosi E, Williams J, Ashley CR, Lambden PR, Clarke IN, Caul EO. (2000)**

A diagnostic EIA for detection of the prevalent SRSV strain in United Kingdom outbreaks of gastroenteritis.

IFU X7844 Überarbeitete Februar 2013

OXOID Limited, Wade Road, Basingstoke,
Hampshire, RG24 8PW, GB

Anfragen jeder Art richten Sie bitte an die für Sie zuständige an Ihren Händler