

Evaluation of a new commercial assay for the detection of norovirus in stool samples

Maria Cristina Arcangeletti, Maria Cristina Medici, Maria del Pilar Esteban, Silvia Preti, Valeria Albonetti, Emanuel Mérép Djouvoup, Giuseppe Dettori, Carlo Chezzi

Sezione di Microbiologia. Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio. Università degli Studi di Parma.

Key words: norovirus; laboratory diagnosis; PCR; immunochromatographic assay

Valutazione di un nuovo saggio commerciale per l'identificazione di norovirus in campioni di feci

SUMMARY

Noroviruses are important human pathogens causing acute gastroenteritis; they can hardly be propagated in any cell culture system and are often difficult to visualize by using electron microscopy (ME). These aspects, as well as the need of an accurate diagnosis justify the development of a number of rapid diagnostic methods aimed at improving the identification of noroviruses and based on the research of viral genomic sequences or, alternatively, of norovirus specific proteins. In this study 60 stool samples were analyzed by traditional techniques, such as cell culture (MT), and by rapid methods like ME and nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (nRT-PCR). A third rapid test, the immunochromatographic assay RIDA®QUICK Norovirus (R-Biopharm) for the research of norovirus proteins (belonging to genogroups I and II), was used retrospectively on the same samples stored at -80°C. The results obtained by using nRT-PCR (i.e. the most sensitive method) and the immunochromatographic assay were compared, showing that 39 samples were positive and 21 negative in nRT-PCR, while only 28 (71.8%) were positive with the immunochromatographic assay; among the negative samples, one resulted positive with RIDA®QUICK Norovirus. The latter test proved to be appreciably sensitive, even if nRT-PCR still remains the gold standard method for the laboratory diagnosis of norovirus. Nevertheless, the easy-to-use and cheaper immunochromatographic assay can be usefully applied as a screening test.

INTRODUZIONE

Il genere Norovirus, appartenente alla famiglia *Caliciviridae*, comprende agenti virali considerati la principale causa di episodi epidemici di gastroenterite acuta non batterica in comunità chiuse, quali scuole, istituzioni, campeggi, navi da crociera, asili, centri universitari e nuclei familiari (6). I norovirus sono stati classificati in 5 genogruppi (GI - GV) i quali, a loro volta, segregano, sulla base di differenze aminoacidiche, in almeno 29 genotipi. Gli stipiti virali responsabili di gastroenterite umana sono compresi più frequentemente nei genogruppi I e II. Nello specifico, molti studi epidemiologici indicano che GII/4 è stato il genotipo prevalente nella popolazione a livello mondiale nell'ambito dell'ultima decade.

I norovirus vengono trasmessi prevalentemente per via fecale-orale; i virioni, acido-resistenti, sono infatti in grado di sopravvivere durante il passaggio attraverso lo stomaco. Tuttavia sembra che tali virus possano essere trasmessi anche per via aerea attraverso particelle di aerosol, quali quelle generate dal vomito violento che spesso si presenta durante la malattia.

Di particolare rilievo è la frequente associazione di episodi epidemici di gastroenterite da norovirus con il consumo di cibi contaminati, quali prodotti da forno surgelati, insalata, molluschi crudi, macedonia di frutta, ghiaccio commerciale ed acqua. I norovirus sono associati a malattia gastrointestinale in tutti i gruppi di età, sebbene la maggioranza degli episodi epidemici di gastroenterite sia segnalata in comunità di anziani, in bambini in età scolastica e in adulti (1). Studi condotti mediante microscopia elettronica (ME) - ovvero attraverso il solo reperto di particelle calicivirus-simili - supporterebbero, invece, una più scarsa circolazione di norovirus in campioni di feci appartenenti a neonati con gastroenterite. D'altra parte, studi condotti utilizzando metodi diagnostici innovativi e più sensibili suggeriscono che un numero di gran lunga maggiore di malattie gastroenteriche in età pediatrica possa essere attribuito a norovirus.

Per quel che riguarda la diagnosi di laboratorio di gastroenterite ad eziologia virale, l'esigenza di arrivare in tempi ridotti ad una corretta identificazione dell'agente in causa è particolarmente sentita, considerando i tempi di esecuzione non brevi delle indagini classiche, quali quelle colturali, così come le difficoltà di coltivazione di numerosi virus che infestano l'uomo e la scarsa sensibilità dell'esame elettromicro-

scopico. Nel corso dell'ultimo decennio, tuttavia, l'introduzione in ambito diagnostico di metodi molecolari sempre più sofisticati, rapidi e dotati di elevata sensibilità nel rilevamento degli acidi nucleici virali, ha dato un notevole impulso alla diagnosi virologica di laboratorio, con una drastica riduzione dei tempi di refertazione ed una aumentata efficienza nel rilevamento dei suddetti componenti virali (5).

Questo studio si è proposto di effettuare la valutazione di un saggio immunocromatografico commerciale, RIDA®QUICK Norovirus della ditta R-Biopharm, per la ricerca di proteine di norovirus (genogruppi I e II), in campioni di feci di soggetti con gastroenterite, a confronto con le tecniche utilizzate quali mezzi diagnostici di routine presso l'U.O. di Virologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma (2, 3, 7).

MATERIALI E METODI

Lo studio in oggetto è stato condotto su 60 campioni fecali, nell'ambito di quelli prelevati nel periodo 2007-2009 da altrettanti soggetti con diagnosi di gastroenterite, ricoverati presso reparti dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma o ambulatoriali. Essi sono stati sottoposti ad indagini virologiche utilizzate in routine diagnostica, quali l'esame colturale con metodo tradizionale (MT) e, nell'ambito delle indagini rapide, ME e reazione polimerasica a catena di tipo nested (4), previa retrotrascrizione (nRT-PCR). Un terzo metodo rapido, applicato retrospettivamente agli stessi campioni conservati a -80°C, è rappresentato dal saggio immunocromatografico RIDA®QUICK Norovirus della ditta R-Biopharm, per la ricerca di proteine di norovirus (genogruppi I e II).

Saggio Immunocromatografico

RIDA®QUICK Norovirus della ditta R-Biopharm è un saggio immunocromatografico per la rilevazione qualitativa di antigeni di norovirus di genogruppo I e II in campioni di feci. Tale saggio si inquadra nell'ambito delle metodologie rapide per la diagnosi di laboratorio delle infezioni da norovirus; pertanto, può essere impiegato per l'analisi di campioni di feci di bambini e adulti con sintomatologia compatibile con gastroenterite da norovirus. È un saggio immunocromatografico su membrana plurifase, nel quale vengono impiegati anticorpi monoclonali specifici anti-norovirus. Oltre alla "finestra" per il campione, l'apparato per il saggio contiene

Corresponding author: Maria Cristina Arcangeletti

Microbiology Section - Department of Pathology and Laboratory Medicine - University of Parma
43100 Parma, Italy - Viale A. Gramsci, 14 - Tel. +39/0521/988885 - Fax. +39/0521/993620
E-mail: mariacristina.arcangeletti@unipr.it.

anche una “finestra” di reazione all’interno della quale sono alloggiate due linee orizzontali con anticorpi immobilizzati. La linea del test (T) contiene anticorpi anti-norovirus, mentre la linea di controllo (C) contiene anticorpi anti-IgG di topo (Figura I). Il coniugato 1 è costituito da anticorpi biotinilati anti-antigene di norovirus, mentre il coniugato 2 è composto da streptavidina marcata con perossidasi di rafano.

RISULTATI

Nell’ambito delle tre metodologie rapide impiegate, la tecnica molecolare è quella dotata di più elevata sensibilità ed è stata pertanto considerata quale metodo di riferimento. D’altra parte, come atteso, l’esame elettromicroscopico per il rilevamento di particelle calicivirus-simili, è la metodologia meno sensibile. In particolare, su 39 campioni di feci positivi per norovirus mediante nRT-PCR, solo 2 hanno rivelato la presenza di calicivirus mediante ME; un terzo campione positivo in ME, è risultato negativo per norovirus in nRT-PCR. I risultati ottenuti con il metodo immunocromatografico considerato in questo studio, a confronto con quello molecolare sono evidenziati in Figura II. Nello specifico, nell’ambito dei 39 campioni risultati positivi per norovirus con la tecnica molecolare, 28 si sono confermati tali anche con il saggio immunocromatografico. Inoltre, per quanto riguarda i 21 campioni negativi per norovirus in RT-PCR, 11 campioni (positivi per altri agenti virali) sono risultati tali anche con il metodo immunocromatografico considerato. Infine, nell’ambito dei 10 campioni negativi per agenti virali selezionati per

Tabella I. Analisi statistica dei risultati ottenuti mediante saggio immunocromatografico RIDA® QUICK Norovirus a confronto con il metodo di riferimento (nRT-PCR).

RIDA® QUICK Norovirus	nRT-PCR - Norovirus		
	P	N	TOT
P	28	1	29
N	11	20	31
TOT	39	21	60
Interpretazione dei risultati P= positivo; N= negativo			

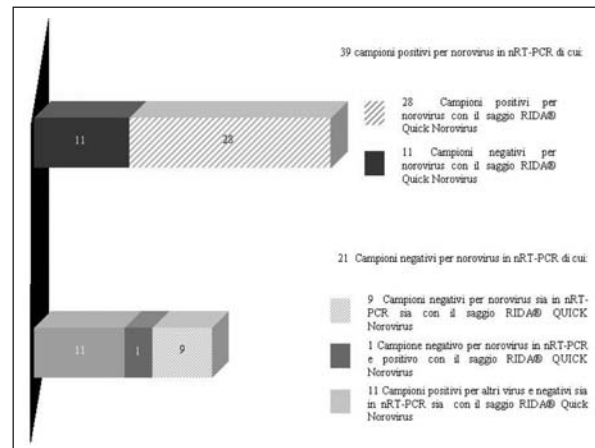


Figure II. Grafico riassuntivo dei risultati ottenuti sui 60 campioni fecali selezionati per lo studio, relativamente alla diagnosi di laboratorio di infezione da norovirus con la tecnica molecolare di routine diagnostica (nRT-PCR) e il saggio immunocromatografico RIDA® QUICK Norovirus.

lo studio, solo 1 ha dato esito positivo mediante RIDA® QUICK Norovirus, mentre 9 sono risultati negativi. La distribuzione dei suddetti dati è stata analizzata statisticamente mediante tabella 2x2 (Tabella 1), da cui si ricava che la sensibilità del metodo immunocromatografico (rispetto al metodo molecolare di riferimento) è del 71.8%, mentre la specificità è risultata pari a 95.2%.

Il livello di concordanza tra il saggio immunocromatografico ed il metodo molecolare di riferimento è stato valutato con il “kappa di Cohen” tramite il programma “QuickCalcs” (GraphPad Prism Software). Per ottenere una interpretazione univoca ed adimensionale di k come stima di concordanza è stata utilizzata la tabella di Landis e Koch (4). In questo studio il programma utilizzato origina un valore di kappa pari a 0.604, con un intervallo di confidenza al 95% da 0.404 a 0.804, indicando che il grado di concordanza è da considerarsi buono (p<0.05).

DISCUSSIONE

Per quel che riguarda la diagnosi di laboratorio di gastroenterite da norovirus, è importante sottolineare come tali agenti non siano coltivabili *in vitro* e, per le loro dimensioni ridotte, risultino spesso difficilmente rilevabili anche mediante esame elettromicroscopico; la loro prevalenza e, soprattutto, il loro impatto sulla salute umana sono stati, pertanto, sottovalutati fino all’introduzione di metodi diagnostici molecolari. D’altra parte, è anche da considerare che tali metodi rimangono, a tutt’oggi, molto costosi ed appannaggio di per-

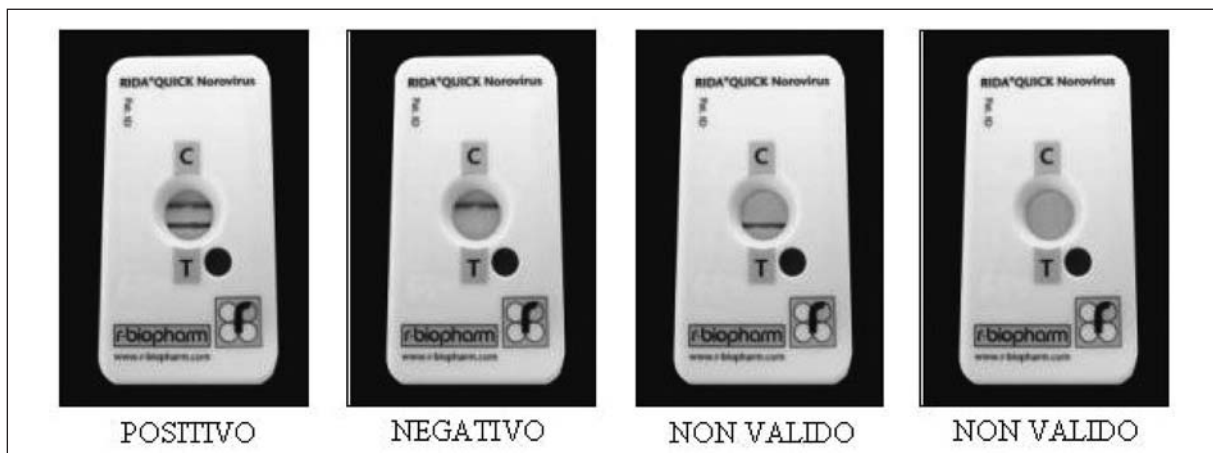


Figura I. Interpretazione dei risultati ottenuti mediante il saggio immunocromatografico RIDA® QUICK Norovirus della ditta R-Biopharm.

sonale specializzato.

Il saggio immunocromatografico RIDA @QUICK Norovirus rappresenta un metodo rapido di semplice utilizzo; esso ha dimostrato una discreta sensibilità ed una buona specificità, anche se, come atteso, la sua performance è inferiore rispetto alla nRT-PCR, a conferma del fatto che le tecniche molecolari, quali quella utilizzata, rappresentano i metodi di elezione per la diagnosi di infezione da norovirus. È, tuttavia, da sottolineare come RIDA @QUICK Norovirus sia stato utilizzato retrospettivamente sui campioni considerati per lo studio rispetto alle indagini elettromicroscopica e molecolare che, invece, sono state applicate agli stessi campioni appena prelevati. Pertanto, è possibile ipotizzare che il congelamento di tali materiali biologici possa avere contribuito ad una parziale alterazione delle proteine virali, abbassando la performance del metodo immunocromatografico.

In conclusione, i costi contenuti, la rapidità e facilità di utilizzo del saggio RIDA @QUICK Norovirus della ditta R-Biopharm, così come i valori soddisfacenti di sensibilità e specificità riscontrati, ne delineano una potenziale utilità quale metodo di screening in caso di episodi epidemici da norovirus, soprattutto in quelle situazioni in cui non si abbia disponibilità di metodi molecolari.

BIBLIOGRAFIA

1. Chen SY, Tsai CN, Lai MW, et al. Norovirus Infection as a Cause of Diarrhoea-Associated Benign Infantile Seizures. *Clinical Infectious Diseases*. 2009; 48: 849-55.
2. Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, et al. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. *Journal of Virological Methods*. 2008; 147: 360-3.
3. Khamrin P, Takanashi S, Chan-it W, et al. Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *Journal of Virological Methods*. 2009; 157: 219-22.
4. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33(1): 159-74.
5. Medici MC, Martinelli M, Ruggeri FM, et al. Broadly reactive nested reverse transcription-PCR using an internal RNA standard control for detection of noroviruses in stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(8): 3772-8.
6. Medici MC, Morelli A, Arcangeletti MC, et al. An outbreak of norovirus infection in an Italian residential-care facility for the elderly. *Clinical Microbiology and Infections*, 2009; 15(1): 97-100.
7. Mutoh K, Hakamata A, Yagi H, Kurokawa K, Miki N, Kurita I. Evaluation of new commercial immunochromatography kit for norovirus in feces. *Pediatrics International*. 2009; 51: 164-6.