

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Evaluation eines Norovirus-spezifischen Bedside-Tests bei Patienten mit  
Gastroenteritis

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elisabeth Katrin Weise  
aus Dresden

Datum der Promotion: 12.09.2014

---

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Einführung .....	1
1.2 Das Genus Norovirus.....	2
1.3 Norovirus-Infektionen .....	3
1.3.1 Epidemiologie und Übertragung .....	3
1.3.2 Klinisches Bild .....	4
1.3.3 Virusausscheidung.....	5
1.3.4 Pathogenese und Immunität .....	6
1.3.5 Diagnostik .....	8
1.3.6 Therapieoptionen.....	11
1.3.7 Prävention .....	12
<b>2. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
3.1 Studiendesign .....	14
3.2 Datenerfassung .....	15
3.3 Materialgewinnung und -lagerung .....	16
3.4 Antigennachweis .....	17
3.4.1 Theoretisches Prinzip von Enzymimmunoassays .....	17
3.4.2 Immunchromatografischer Schnelltest (IC).....	18
3.4.3 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA).....	19
3.5 Nachweis von Norovirus-RNA .....	20
3.5.1 Theoretisches Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	20

---

3.5.2 PCR im Institut für Virologie der Charité.....	20
3.5.3 PCR im Partnerlabor der R-Biopharm AG in Darmstadt .....	21
3.6 Statistische Auswertung.....	21
3.6.1 Probenbezogene Auswertung.....	22
3.6.2 Patientenbezogene Auswertung .....	22
3.6.3 Bestimmung der Testzuverlässigkeit in Ausbruchssituationen.....	23
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
4.1 Studienverlauf .....	25
4.2 Studienpopulation.....	25
4.3 Methodenvergleich und probenbezogene Auswertung .....	27
4.4 Patientenbezogene Auswertung .....	34
4.5 Bestimmung der Testzuverlässigkeit in Ausbruchssituationen.....	40
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>43</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>VIII</b>
Eidesstattliche Versicherung.....	VIII
Publikationsliste und Anteilserklärung.....	IX
Lebenslauf.....	X
Danksagung.....	XII
Datentabellen .....	XIII

---

## Abkürzungsverzeichnis

Ct	engl. „cycle treshold“ = Schwellenwert-Zyklus
DNA	engl. „desoxyribonucleic acid“ = Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
ELISA	engl. Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay = enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
GE	Gastroenteritis
GG	Genogruppe
IC	immunchromatografischer Schnelltest
Ig	Immunglobulin
kbp	Kilobasenpaare
<i>m</i>	Median
<i>n</i>	Anzahl
NV	Norovirus bzw. Noroviren
ORF	engl. “open reading frame” = offener Leserahmen
<i>p</i>	Wahrscheinlichkeit
PCR	engl. “polymerase chain reaction” = Polymerasekettenreaktion
<i>R</i>	engl. „range“ = Spannweite
RNA	engl. “ribonucleic acid” = Ribonukleinsäure
<i>s</i>	Anzahl positive Befunde
<i>se</i>	Sensitivität
<i>sp</i>	Spezifität
VLP	engl. “ virus-like particles“ = Virus-ähnliche Partikel

### **Zusammenfassung**

Noroviren gehören weltweit zu den häufigsten Erregern akuter nicht-bakterieller Gastroenteritis. Infektionen sind charakterisiert durch rasche, ausbruchartige Ausbreitung, insbesondere in Gemeinschaftseinrichtungen, und verlaufen meist selbstlimitierend, jedoch sind protrahierte und komplikationsreiche Verläufe für vulnerable Patientengruppen beschrieben. Bei rein symptomatischen Therapieoptionen liegt das primäre Ziel im frühzeitigen Erkennen und Einleiten von Infektionsschutzmaßnahmen.

Die Diagnosestellung kann durch klinische Kriterien erfolgen, deren Sensitivität und Spezifität sind jedoch begrenzt. Als diagnostischer „Goldstandard“ gilt derzeit die real-time PCR. Dieses Verfahren ist hochsensitiv, die Testergebnisse sind jedoch nicht unmittelbar verfügbar. Enzymimmunoassays sind weniger sensitiv, jedoch hochspezifisch, kostengünstig, einfacher und schneller durchführbar.

Der Norovirus-spezifische Enzymimmunoassay RIDA<sup>®</sup>QUICK NV wurde in dieser Studie erstmals als Bedside-Test unter realistischen Bedingungen im Klinikalltag evaluiert und zeigte sich mit bisherigen Evaluierungsstudien, welche durchweg unter standardisierten Laborbedingungen erfolgten, vergleichbar. Bei 65 Studienpatienten mit Gastroenteritis betrug die Sensitivität 53 % bei einer hohen Spezifität von 97 %.

Die Durchführung erforderte Aufmerksamkeit, ermöglichte aber innerhalb von 20 Minuten patientennah ein Testergebnis. Variierende, begrenzt standardisierten Testbedingungen (z.B. Probenhomogenisierung) sowie Testung frischer, zwischenzeitlich nicht gefrorener Proben scheinen sich negativ auf die Testsensitivität auszuwirken. Die Sensitivität der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Nachtestung aller Proben unter standardisierten Bedingungen war höher als in der Bedside-Testung (56 % versus 44 %).

Ein positiver Bedside-Test war mit höheren Viruslasten (niedriger Ct-Wert PCR, hohe Extinktion ELISA) assoziiert ( $p \leq 0,0057$ ). Ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Erkrankung (hoher Severity Score) oder der Anzahl der Tage zwischen Symptombeginn und Bedside-Testung wurde nicht festgestellt. Die serielle Nachtestung initial falsch-negativer Bedside-Testungen (n=4) war bei ambulant behandelten Patienten und Verlegungen nicht konsequent umsetzbar und zeigte lediglich bei einem Patienten im Verlauf eine Konversion in einen richtig-positiven Befund.

Der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV wurde für Stuhlproben entwickelt. In dieser Arbeit wurden erstmals auch Proben aus Erbrochenem (n=3) und Ileostomata (n=2) mit einem positiven Befund im Erbrochenen getestet.

Zusammenfassend handelt es sich beim RIDA<sup>®</sup>QUICK NV um ein kostengünstiges, im Klinikalltag und Bereichen, in denen Labormethoden nicht unmittelbar zur Verfügung stehen, praktikables Instrument zum Norovirusnachweis. Die Testung mehrerer erkrankter Personen ermöglicht bei hoher Testspezifität eine zuverlässige Identifizierung von Ausbrüchen, wobei die Untersuchung von 8 – 17 Proben mittels RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung (kumulative Wahrscheinlichkeit >90 %) genügt. Bei Testung von 4 Proben eines Ausbruchs ist ein positiver Befund zur korrekten Identifikation von Norovirus als Infektionserreger ausreichend. In Zweifelsfällen und Gefährdung von Risikopatienten sollten jedoch, insbesondere negative Testbefunde, mittels PCR verifiziert werden. Eine Optimierung der Sensitivität und weitere Vereinfachung der Handhabung des RIDA<sup>®</sup>QUICK NV ist für künftige Testvarianten wünschenswert.

## **Abstract**

Noroviruses belong to the most common causes of acute non-bacterial gastroenteritis. Norovirus infections are characterized by outbreaks with rapid spreading. The disease is usually self-limited, but prolonged symptoms in vulnerable patients have been described. Treatment consists in supportive care, so early recognition with infection control measures is important.

Norovirus infections may be diagnosed by clinical criteria, but these exhibit limited sensitivity and specificity. In contrast, Norovirus-specific PCR displays a high sensitivity and is accepted as diagnostic standard, but the results are not always readily available. Immunoassays are less sensitive but highly specific, faster and more cost-efficient.

Compared to previous studies using stored samples and standardised laboratory conditions, the Norovirus-specific immunoassay RIDA<sup>®</sup>QUICK NV was evaluated in this trial for the first time in daily clinical routine. In 65 unselected patients with gastroenteritis, this test showed limited sensitivity of 53 % and a specificity of 97 %.

Test performance required attention but results were available within 20 minutes. Varying test conditions (eg, specimen homogenization) and use of fresh samples appeared to impact test sensitivity. The sensitivity was higher under standardised laboratory conditions compared to bedside-testing of samples (56 % versus 44 %).

A positive bedside test was associated with higher viral loads (low Ct value in PCR, high extinction in ELISA,  $p < 0,0057$ ). We observed no correlation between a clinical severity score or number of days between onset of symptoms and bedside testing with correct-positive versus false-negative test results. Serial testing of initially false-negative tested patients ( $n=4$ ) was not always feasible due to outpatient care, early discharges and transfers between wards. However, serial testing in a single patient showed conversion from false-negative into a correct-positive bedside test result.

The RIDA<sup>®</sup>QUICK NV was developed for human stool samples. In this study, also vomit ( $n=3$ ) and samples from ileostoma ( $n=2$ ) were tested with a positive result in vomit.

In conclusion, RIDA<sup>®</sup>QUICK NV is a simple, cost-efficient diagnostic tool, applicable in clinical routine and settings where laboratory methods are not readily available. With respect to its high specificity, this test enables a reliable identification of Norovirus outbreaks. To identify an outbreak, testing 8 to 17 samples (cumulative probability  $>90\%$ ) or one positive result out of 4 tested samples is sufficient. However, in doubtful cases and situations that pose vulnerable

patients at risk, negative results should be confirmed by PCR testing. Finally, an improved test sensitivity and more simplified test procedures should be envisaged in future test versions.



## 1. Einleitung

### 1.1 Einführung

Die infektiöse Gastroenteritis (GE) ist weltweit eine sehr häufige Ursache für Morbidität und Mortalität in allen Altersgruppen. Das Erregerspektrum umfasst zahlreiche Bakterien, Viren und Parasiten. Epidemiologische Studien zeigten, dass in Großbritannien jeder fünfte Einwohner mindestens einmal im Jahr betroffen ist, wobei hier Patienten in Pflegeeinrichtungen und Krankenhäusern noch nicht berücksichtigt sind.<sup>1</sup>

Bereits 1929 beschrieb der englische Pädiater J. Zahorsky erstmals das Syndrom „winter vomiting disease“. Dies ist charakterisiert durch plötzlich einsetzendes Erbrechen sowie Diarrhoen und tritt besonders in den Wintermonaten ausbruchartig auf.<sup>2</sup> Ähnliche Ausbrüche wurden in der Literatur wiederholt beschrieben, jedoch blieb die Ätiologie in 47 bis 75 % der Fälle ungeklärt.<sup>1,3,4</sup> Versuche in den 50er bis 70er Jahren mit oraler Gabe von bakterienfreien Stuhlfiltraten Erkrankter an gesunde Probanden konnten die Übertragbarkeit der Erkrankung belegen und ließen eine virale Genese vermuten.<sup>3</sup> Erfolglos blieben jedoch frühe Versuche eines Erregernachweises in Zellkulturen.<sup>3</sup> Erst 1972 gelang Kapikian der immunoelektronenmikroskopische Nachweis von 27 nm großen Viruspartikeln in Stuhlproben von Erkrankten.<sup>5</sup> Diese Viruspartikel wurden nach ihrer Entdeckung in Stuhlfiltraten eines Ausbruchs, der 1968 in Norwalk, Ohio stattfand, als Norwalk-Virus bezeichnet. Bei diesem Ausbruch waren 50 % der Schüler und Lehrer einer Grundschule sowie 30 % der jeweiligen Familienmitglieder an plötzlicher Übelkeit, Erbrechen und Bauchkrämpfen erkrankt.<sup>6</sup> Es folgte der Nachweis gleichartiger Viruspartikel in Proben vergleichbarer Ausbrüche. Diese Viruspartikel wurden zunächst als „Norwalk-like viruses“ und basierend auf ihrer Morphologie als Gruppe der „small round structured viruses“ - heute Norovirus (NV) - zusammengefasst.<sup>3</sup>

Fortschritte in der Molekularbiologie ermöglichten die Charakterisierung des Viruskapsids und 1990 gelang die Klonierung des Virusgenoms.<sup>7,8</sup> Damit war der Grundstein für die Entwicklung sensitiver Nachweisverfahren gelegt. Die Reevaluation von Stuhlproben mit molekularen Methoden reduzierte die diagnostische Lücke beim Nachweis von Darmpathogenen in einer Studie von 47 auf 25 % gegenüber den konventionellen Verfahren.<sup>1</sup> Der Anteil NV-bedingter GE stieg deutlich an.<sup>9</sup> Heute gelten NV weltweit als häufigster Erreger plötzlich einsetzender, nicht-bakterieller GE bei Erwachsenen und nach Rotaviren als zweithäufigster Auslöser bei Kindern.<sup>9,10</sup> Infektionen mit NV bedingen 47 bis 96 % der Ausbrüche und 5 bis 36 % der sporadischen Fälle akuter GE weltweit.<sup>9,10</sup> NV-Infektionen sind eine häufige Ursache GE-

bedingter stationärer Aufnahmen bei Erwachsenen und für etwa 12 % der GE-Fälle bei Kindern unter 5 Jahren verantwortlich.<sup>9,11</sup> Das US-amerikanische Center of Disease Control schätzt die Zahl der jährlichen NV-Infektionen in den USA auf 21 Millionen, welche etwa 70.000 Hospitalisierungen und 800 Todesfälle nach sich ziehen.<sup>12</sup> Der größte Anteil von Ausbrüchen entfällt dabei auf Krankenhäuser und Pflegeeinrichtungen.<sup>12,13</sup> Nicht selten müssen ganze Stationen gesperrt werden, um einer weiteren Ausbreitung entgegenzuwirken und neben teils schwerwiegenden Folgen für die Betroffenen entstehen massive ökonomische Belastungen.<sup>13,14</sup>

### 1.2 Das Genus Norovirus

Das Internationale Komitee zur Virusklassifikation ordnet NV der Familie der Caliciviridae, benannt nach ihrer kalyxartigen Erscheinung unter dem Elektronenmikroskop, zu. Die Caliciviridae werden in die ausschließlich tierpathogenen Gattungen Vesivirus, Lagovirus und Nebovirus sowie die zusätzlich humanpathogenen NV und Sapoviren unterteilt.<sup>15</sup>

Bei NV handelt es sich um eine Gruppe von RNA-Viren mit einem Durchmesser von 27 bis 40 nm. Das Genom besteht aus einem linearen, positiv gerichteten RNA-Einzelstrang, welcher von einem unbehüllten, ikosaedrischen Viruskapsid umgeben ist. Die RNA umfasst etwa 7,5 bis 7,7 kbp und beinhaltet drei offene, sich zum Teil überlappende Leserahmen (ORF 1-3). ORF 1 kodiert ein Polyprotein, das durch die Virus-eigene Protease gespalten und zu 6 Nichtstrukturproteinen prozessiert wird. Diese sind unter anderem an der Virusreplikation beteiligt. ORF 2 und 3 kodieren die Kapsidproteine VP1 und VP2.<sup>10,11</sup>

NV weisen eine ausgeprägte genetische und Antigenvielfalt auf.<sup>16</sup> Basierend auf Sequenzierungen und phylogenetischen Analysen werden sie in fünf Genogruppen (GG) gegliedert. Lediglich GG I, II und IV sind humanpathogen. Innerhalb der GG kommt es zu einer weiteren Unterteilung in Genotypen. Derzeit werden der GG I mindestens 9, der GG II 19 und der GG IV 2 Genotypen zugeordnet.<sup>17</sup> Die große Vielfalt der NV lässt sich auf genetische Instabilität zurückführen. Da die virale, RNA-abhängige RNA-Polymerase keine Korrekturfunktion („proof-reading“) besitzt, häufen sich bei der Replikation Lesefehler an.<sup>11,18</sup> Zusätzlich wurde der Antigenshift durch inter- und intratypische Rekombination bei NV beschrieben.<sup>11,19</sup>

Das Kapsid eines kompletten Virus wird aus 90 VP1-Dimeren und wenigen VP2-Molekülen gebildet, VP1-Moleküle können aber auch kleinere, leere Viruspartikel formen.<sup>11</sup> Das Kapsid schützt die Viren vor widrigen Umwelteinflüssen. Im Vergleich zu behüllten Viren oder Bakterien sind sie resistenter gegenüber Austrocknung, Temperaturen bis zu 60 °C sowie

Einfrieren und unempfindlicher gegenüber hohen Chlorkonzentrationen sowie den meisten herkömmlichen Desinfektionsmitteln.<sup>20,21</sup> NV-Partikel können auf Oberflächen, in Nahrungsmitteln oder in Wasser überdauern und zur effektiven Virusinaktivierung sind spezielle Maßnahmen und Reinigungsmittel erforderlich.<sup>11,21</sup> Das Viruskapsid ist zudem an der Erkennung und Bindung der Wirtszelle beteiligt. So interagieren oberflächenexponierte, variable Domänen des VP1 mit spezifischen Kohlenhydratstrukturen, welche ABH- und Lewis-Blutgruppenantigenen entsprechen und an der Oberfläche reifer Enterozyten im Dünndarm exprimiert werden.<sup>11,22</sup> Durch künstliche Expression von ORF 2 und 3 konnten Virus-ähnliche Partikel (VLPs) synthetisiert werden, die eine große Antigen-Ähnlichkeit mit intakten Viruspartikeln aufweisen.<sup>23,24</sup> Sie bilden eine wichtige Grundlage für die Erforschung der Immunologie, der Virus-Zell-Interaktion und Rezeptorerkennung sowie der Entwicklung von modernen Nachweisverfahren, zum Beispiel Enzymimmunoassays, und Impfstoffen.<sup>22,25</sup>

### **1.3 Norovirus-Infektionen**

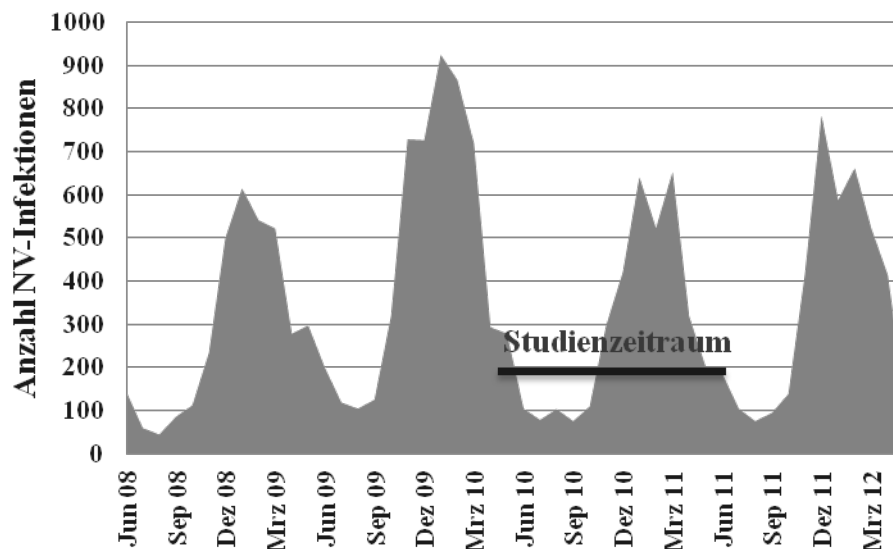
#### **1.3.1 Epidemiologie und Übertragung**

NV-Partikel finden sich reichlich im Stuhl und Erbrochenen infizierter Personen. Die infektiöse Dosis ist, relativ zu etwa 30 Millionen Viruspartikeln, die bei einmaligem Erbrechen freigesetzt werden können, mit 10 bis 100 Viruspartikeln sehr gering.<sup>26,27</sup> Zusammen mit der außerordentlichen Umweltresistenz erklärt dies die hohen Ansteckungsraten und den meist raschen Anstieg an Neuerkrankungen im Rahmen von Ausbrüchen.<sup>11,20</sup> Eine Häufung in gemäßigten Klimazonen sowie in den Wintermonaten ist regelhaft zu beobachten (Abbildung 1).<sup>28</sup> Auffällig ist zudem, dass die Erkrankungszahlen sich etwa alle 2 bis 4 Jahre epidemieartig häufen.<sup>11</sup> Weltweit wurden die meisten Fälle und Ausbrüche der vergangenen Jahre durch Varianten des Genotyps II.4 ausgelöst.<sup>11,22,29</sup>

Die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt meist fäkal-oral oder über den Handkontakt mit kontaminierten Oberflächen.<sup>11,20</sup> Zudem kann die orale Aufnahme von infektiösen Aerosolen, wie sie beim schwallartigen Erbrechen freigesetzt werden, zu einer Infektion führen.<sup>11,30</sup> Ausbrüche von NV-GE treten bevorzugt in Gemeinschaftseinrichtungen wie Schulen, Hotels, Kreuzfahrtschiffen oder Militärcamps auf.<sup>10,12,20</sup> Besonders relevant sind diese in Krankenhäusern und Pflegeheimen, wo mehrfach Erkrankungsraten von über 50 % und Komplikationen bei Risikopatienten beobachtet wurden.<sup>13,20,31</sup>

Eine weitere wichtige Infektionsquelle stellen Lebensmittel und Wasser dar.<sup>11,20</sup> So können Viruspartikel über den Handel mit kontaminierten Nahrungsmitteln verbreitet werden oder durch

erkranktes Küchenpersonal in die Nahrungsmittel gelangen.<sup>20,32</sup> Die Indexpersonen selbst können dabei oligo- oder sogar asymptomatisch sein.<sup>33</sup> Als Ausbruchquelle lassen sich häufig kontaminierte Lebensmittel wie Meeresfrüchte, in denen teils verschiedene Genotypen parallel nachgewiesen wurden, oder Tiefkühlobst identifizieren.<sup>11,20,32</sup> Die weitere Ausbreitung erfolgt auf fäkal-oralem Weg, über kontaminierte Oberflächen und Aerosole.<sup>11,20</sup>



**Abbildung 1: Gemeldete NV-Infektionen im Zeitraum Juni 2008 bis Mai 2012 für Berlin (Datenquelle: Robert Koch-Institut, SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 11.06.2012)**

### 1.3.2 Klinisches Bild

Das klinische Bild einer NV-Infektion ist charakteristisch. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 10 bis 51 Stunden kommt es zu plötzlich einsetzendem Erbrechen, meist gefolgt von Diarrhoe.<sup>11,34</sup> Begleitend können Übelkeit, abdominelle Schmerzen und Krämpfe, Fieber sowie Kopf- und Gliederschmerzen auftreten.<sup>34,35</sup> Bei gesunden Personen verläuft die Infektion in der Regel mit einer Erkrankungsdauer von 12 bis 60 Stunden selbstlimitierend.<sup>36</sup> Der mittlere Schweregrad, wie er beispielsweise mit klinischen Scores wie der Vesikari-Skala oder dem Severity Score abgeschätzt werden kann, ist meist geringer im Vergleich zu Infektionen mit anderen viralen Enteropathogenen.<sup>35,37</sup> Prinzipiell sind alle Altersgruppen betroffen, die höchsten Erkrankungsraten finden sich aber in der Pädiatrie und Geriatrie.<sup>34</sup> Bei Kindern steht Erbrechen im Vordergrund, während bei Erwachsenen und hospitalisierten Patienten vorrangig Durchfälle auftreten.<sup>20,35</sup> Blutige Diarrhoen oder Schleimbeimengungen im Stuhl sind selten.<sup>11</sup> Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild können mit der Vielfalt zirkulierender NV-Varianten

zusammenhängen.<sup>22,38</sup> So wurde berichtet, dass Genotyp II.4-Infektionen vermehrt mit Erbrechen einhergehen.<sup>38</sup>

Die Beschreibungen von Symptomen und klinischem Verlauf beruhen maßgeblich auf Freiwilligenversuchen und Ausbruchsanalysen, wobei vorwiegend sonst gesunde Erwachsene betrachtet wurden.<sup>35</sup> Untersuchungen bei hospitalisierten Patienten mit NV-GE zeigten eine längere mittlere Krankheitsdauer von 72 Stunden bis zu 5 Tagen und bei Kindern unter 1 Jahr eine mittlere Erkrankungsdauer von 6 Tagen.<sup>34,35</sup> Nach Sistieren der akuten Symptome wurden bei Bewohnern eines Seniorenheims bis zu 19 Tage fortdauernde unspezifische Beschwerden wie Lethargie, Anorexie, Schwindel oder Durst beobachtet, welche das Sturzrisiko erhöhen.<sup>39</sup> Protrahierte und schwere Verläufe sind bei besonders vulnerablen Patientengruppen beschrieben.<sup>34</sup> Zu den Risikofaktoren zählen Alter <5 oder >65 Jahre, Immunsuppression, kardiovaskuläre Grunderkrankung und eine Organtransplantation in der Anamnese.<sup>11,31,40</sup> Klinisch kann es zu schwerer Dehydratation sowie Elektrolytverschiebungen bis hin zum Nierenversagen kommen und so eine Hospitalisierung erforderlich machen.<sup>11,31</sup> Selten wurden Todesfälle im Zusammenhang mit NV-Ausbrüchen in Pflegeheimen oder Krankenhäusern sowie sporadischen Einzelfällen berichtet.<sup>10,41</sup> Eine wesentlich verlängerte Erkrankungsdauer und chronische Verläufe wurden insbesondere bei immunsupprimierten Patienten nach Organ- oder Stammzelltransplantation beobachtet.<sup>42,43</sup> Die Symptome können dabei sehr variabel ausgeprägt sein und in Einzelfällen sind tödliche Komplikationen beschrieben.<sup>43,44</sup> Wichtig bei Patienten nach allogener Blutstammzelltransplantation ist die Abgrenzung zur Graft-versus-Host-Erkrankung (engl. für Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion), da auch diese sich mit protrahierten Diarrhoen bemerkbar machen kann, jedoch eine Intensivierung der immunsuppressiven Therapie erfordert.<sup>40,42,44</sup>

### 1.3.3 Virusausscheidung

NV-Partikel werden im Stuhl und Erbrochenen ausgeschieden. Die ursprüngliche Annahme, die Virusausscheidung sei auf etwa 100 Stunden begrenzt, musste mit der Entwicklung hochsensitiver Nachweismethoden revidiert werden.<sup>45</sup> Vielfach ist noch Wochen nach Abklingen der Symptome Virusmaterial im Stuhl nachweisbar.<sup>35,46-48</sup> Der Median der Ausscheidungsdauer lag bei 28,5 ( $R=13,5-44,5$ ) Tagen bei älteren Patienten und 16 ( $R=5-47$ ) Tagen bei Kindern.<sup>49,50</sup> Bei transplantierten sowie immunsupprimierten Patienten wurde eine Dauer von mehr als 80 Tagen und bis zu 2 Jahren berichtet.<sup>40,43,51</sup> Die Ausscheidung von NV-Partikeln überdauert

folglich die klinischen Symptome, konnte jedoch auch bei asymptomatischen Personen und vereinzelt prodromal nachgewiesen werden.<sup>32,39,46</sup>

Die Angaben zur mittleren Viruskonzentration schwanken zwischen  $8,4 \times 10^5$  und  $3,81 \times 10^8$  NV pro g Stuhl, wobei höhere Viruslasten bei GG II gegenüber GG I beobachtet wurden.<sup>32,46,47,51,52</sup>

Die höchsten Konzentrationen im Stuhl zeigen sich bei Infektionen mit Genotyp II.4, möglicherweise ein Erklärungsansatz für das weltweite Vorherrschen.<sup>32</sup> Verschiedene Studien befassten sich mit der Höhe der Virusausscheidung, wobei kein konsistenter Unterschied in Proben symptomatischer gegenüber asymptomatischer Personen nachweisbar war.<sup>1,32,51</sup> Auch konnten keine Zusammenhänge zwischen der Viruslast und dem klinischen Schweregrad, der Ausscheidungs- oder Symptombdauer gezeigt werden, so dass die Viruslast im Stuhl vermutlich eine Momentaufnahme der Pathophysiologie im Darm widerspiegelt die Schwankungen unterliegt.<sup>39,51</sup> Störungen des Immunsystems, wie sie unmittelbar nach Chemotherapie und bei Neutropenie auftreten, sind mit höheren Viruskonzentrationen sowie schweren, komplikationsreichen Verläufen assoziiert.<sup>44,51</sup>

NV zirkulieren in der Umwelt sowie der symptomatischen und asymptomatischen Bevölkerung. Es bleibt jedoch unklar, wann die Ausscheidung als infektiös anzusehen ist.<sup>10,18</sup> Übertragungen nach einem 2- bis 3-tägigem symptomfreien Intervall sind bisher nicht berichtet worden, so dass im Ausbruchmanagement Patienten  $\geq 48$  Stunden nach Sistieren der Symptome als nicht mehr infektiös betrachtet werden.<sup>20</sup>

### **1.3.4 Pathogenese und Immunität**

Die Anzüchtung von NV in der Zellkultur sowie die Suche nach einem geeigneten Tiermodell erwiesen sich bislang als wenig erfolgreich.<sup>3</sup> Nur wenige Versuche zur experimentellen Virusreplikation mit humanpathogenen NV in einem komplexen 3D-Zellkulturmodell oder gnotobiotischen Tieren waren erfolgreich.<sup>53-55</sup> Die Erforschung der Pathomechanismen beschränkt sich somit vorwiegend auf Studien mit Freiwilligen sowie Ausbruchsanalysen.

Die säurestabilen NV passieren den Magen und gelangen in den Dünndarm, wo sie direkt an Enterozyten binden.<sup>11</sup> Histopathologische Untersuchungen von Dünndarmbiopsien zeigen nach Infektion mit NV entzündliche Epithelveränderungen mit Abflachung und Verkürzung der Zotten, erweitertem endoplasmatischen Retikulum, zytoplasmatischen Vakuolen sowie einem dichten Lymphozyteninfiltrat in der Lamina propria.<sup>56,57</sup> Eine reduzierte Aktivität der Bürstensaumenzyme bewirkt eine transiente Kohlenhydratmalabsorption und Steatorrhoe.<sup>56</sup> Gezeigt wurde zudem eine Störung der Epithelbarriere durch Verminderung der Tight Junction-

bildenden Proteine sowie eine erhöhte Anionen-Sekretion.<sup>57</sup> Biopsien und CT-Untersuchungen des gesamten Gastrointestinaltrakts zeigten, dass diese Veränderungen reversibel und auf den Dünndarm beschränkt sind.<sup>11,44,58</sup>

Interessanterweise waren in Studien etwa 30 % der infizierten Freiwilligen asymptomatisch.<sup>48</sup> Welcher Pathomechanismus zu einer symptomatischen Infektion führt, ist noch unklar.<sup>10</sup> Nach Infektion wurde bei Freiwilligen eine kurzfristige Immunität von 6 bis 14 Wochen Dauer beobachtet und eine erneute Infektion nach 2 bis 3 Jahren war möglich.<sup>59</sup> Die Prävalenz NV-spezifischer Antikörper im Serum liegt bei Kindern unter 5 Jahren bei 50 %, steigt im Alter von 10 Jahren auf 60 bis 90 % an und erreicht nahezu 100 % bei Erwachsenen.<sup>22</sup> Allerdings ist weder das Vorkommen von NV-spezifischen IgA, IgG oder IgM mit einem Schutz vor Infektion assoziiert.<sup>25</sup> Vielmehr scheinen Personen mit niedrigem Antikörper-Titer weniger empfänglich für NV-Infektionen zu sein, was möglicherweise durch eine genetisch determinierte Resistenz gegenüber spezifischen Genotypen erklärbar ist.<sup>20,60</sup> Hohe Titer sprechen hingegen für eine erst kürzlich stattgehabte Infektion mit einer verwandten Virusvariante.<sup>60</sup>

Die Bindung der Viruspartikel an reife Enterozyten erfolgt über spezifische, genetisch determinierte Kohlenhydratstrukturen, wie sie auch in ABH- und Lewis-Blutgruppenantigenen vorkommen.<sup>22</sup> An der Bildung dieser Strukturen sind verschiedene Enzyme beteiligt, beispielsweise determiniert die  $\alpha$ 1,2-Fucosyltransferase (FUT2) den Sekretorstatus. Es wurde gezeigt, dass Sekretor-negative Personen (etwa 20 % der europäischen Bevölkerung) weniger empfindlich gegenüber NV-Infektionen sind als Sekretor-positive Personen.<sup>61</sup> Allerdings unterscheiden sich die verschiedenen Genotypen in ihren Bindungseigenschaften.<sup>22</sup> So ist der Sekretorstatus entscheidend bei Genotyp I.1, während andere Genotypen über alternative Rezeptoren bzw. Blutgruppeneigenschaften an die Wirtszelle binden.<sup>22</sup> Ähnlich dem Influenza-Virus konnte eine Evolution der Viren in der Bevölkerung gezeigt werden.<sup>11,18</sup> So begünstigt Antigendrift Änderungen besonders in den hoch-variablen, oberflächenexponierten Kapsid-Domänen.<sup>22</sup> Bereits ein Basenaustausch kann wesentliche Änderungen des Bindungsverhaltens sowie der Virulenz und Übertragbarkeit einzelner Virusvarianten bewirken.<sup>22</sup> Dies ermöglicht die Umgehung einer vorhandenen Immunantwort, was chronische und rezidivierende NV-Infektionen einzelner Personen sowie epidemieartiges Auftreten von Ausbrüchen durch neue Virusvarianten begünstigt.<sup>16,18,22</sup>

### 1.3.5 Diagnostik

Traditionell wird die Diagnose einer NV-Infektion anhand des typischen klinischen Bildes gestellt. Lopman *et al.* definierten einen individuellen Fall von NV-GE als das Auftreten von (a)  $\geq 2$ -mal Erbrechen, (b)  $\geq 3$  dünne Stühle oder (c) Beidem innerhalb von 24 Stunden.<sup>34</sup> Ausbrüche akut einsetzender nicht-bakterieller GE gelten als vereinbar mit NV als ursächlichem Erreger, wenn sie die 1982 von Kaplan *et al.* aufgestellten klinischen und epidemiologischen Kriterien erfüllen (Abbildung 2).<sup>36</sup>



**Abbildung 2: Kaplan-Ausbruchskriterien**<sup>36</sup>

Charakteristisch ist das plötzlich einsetzende schwallartige Erbrechen bei Erwachsenen, wodurch sich Infektionen mit NV klinisch von anderen viralen oder bakteriellen Erregern unterscheiden.<sup>6,62</sup> So wurde alternativ zum Kaplan-Kriterium der kurzen Inkubationszeit vorgeschlagen, das in Relation zum Fieber gehäufte Auftreten von Erbrechen einzubeziehen.<sup>63</sup> Bei der Differenzierung NV-bedingter von bakteriell-verursachten GE-Ausbrüchen zeigten die klassischen Kaplan-Kriterien eine Sensitivität von 68 % und Spezifität von 99 %.<sup>64</sup>

Im Labor stehen heute verschiedene Methoden basierend auf der Detektion unterschiedlicher Virusbestandteile zur Verfügung. Unter dem Elektronenmikroskop können intakte Viruspartikel erst ab Konzentrationen von  $10^6$  bis  $10^7$  Viren pro ml Stuhl direkt sichtbar gemacht werden.<sup>20,25</sup> Durch Immunelektronenmikroskopie kann die Nachweisgrenze um den Faktor 10 bis 100 gesteigert werden.<sup>20</sup> Die Elektronenmikroskopie bietet den Vorteil, jegliche in geeigneter Konzentration in der Probe vorkommenden viralen Pathogene nachzuweisen.<sup>65</sup> Allerdings setzt sie teure und aufwändige Technik voraus, ist stark abhängig von der Erfahrung des Untersuchers und lediglich zur Analyse einer begrenzten Probenzahl anwendbar.<sup>25</sup> Bei einer geringen Sensitivität von 24 bis 59 % verglichen mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde sie heute weitestgehend von molekularen Methoden abgelöst.<sup>65,66</sup>

Der Nachweis viraler RNA kann mit Hilfe der PCR, verschiedener Hybridisierungsassays, Gelelektrophorese und Sequenzierung erfolgen. Bereits Anfang der 90er Jahre, nach erfolgreicher Klonierung, wurden erste PCR-Verfahren beschrieben und kontinuierlich



weiterentwickelt.<sup>25</sup> Die anschließende Sequenzierung des PCR-Produktes ermöglicht die exakte Bestimmung der Virusvariante und erlaubt im Rahmen epidemiologischer Studien den Vergleich mit bereits bekannten Sequenzen.<sup>25</sup> So konnten beispielsweise NV in Tiefkühlhimbeeren als Ursache mehrerer Ausbrüche weltweit identifiziert werden.<sup>11,20</sup> Als sensitivstes Verfahren erwies sich die nested PCR (engl. für „verschachtelte PCR“), welche jedoch ein höheres Risiko falsch-positiver Befunde durch Kontamination aufweist.<sup>25</sup> Als diagnostischer „Goldstandard“ hat sich die real-time PCR (engl. für „Echtzeit-PCR“) durchgesetzt.<sup>11</sup> Dieses Verfahren wird auch als quantitative PCR bezeichnet, da es neben dem qualitativen Nachweis die Möglichkeit bietet, zeitgleich anhand des Ct-Wertes semiquantitative Aussagen zur Viruslast zu treffen.<sup>11,47</sup> Zudem können mittels real-time PCR mehr Proben bei geringerem Risiko für Kontaminationen bzw. falsch-positive Befunde untersucht werden.<sup>47,67</sup> Mit einer Nachweisgrenze von nur  $10^2$  bis  $10^4$  Viruspartikeln pro ml Stuhl eignet sie sich zur Untersuchung von Proben mit potenziell geringerer Viruskonzentration, beispielsweise Nahrungsmittel, Wasser, Rachen- und Oberflächenabstriche.<sup>20,25</sup> Allerdings ist sie im Labor aufwändig, kostenintensiv und erst bei Testung mehrerer Proben rentabel.<sup>65,68</sup> Eine PCR-Diagnostik ist nicht überall verfügbar (z.B. Kreuzfahrtschiffe, ländliche Gegenden) und Testergebnisse liegen oftmals erst nach 1 bis 3 Tagen vor.<sup>69,70</sup> Ein standardisiertes, allgemein akzeptiertes PCR-Protokoll existiert zudem bislang nicht. Beim Vergleich verschiedener Protokolle im Rahmen einer europäischen, multizentrischen Studie konnten NV lediglich in 84 % der Fälle mit zumindest einem Verfahren nachgewiesen werden, wobei die Sensitivität zwischen 52 und 73 % schwankte.<sup>71</sup> Dies kann einerseits in der möglichen Alteration der Proben bei Lagerung und Transport, unterschiedlich effektiven Methoden zur RNA-Extraktion, Degradation extrahierter RNA, natürlich vorkommenden Inhibitoren in der Probe oder Kontaminationen begründet liegen.<sup>25,71</sup> Andererseits zirkuliert weltweit eine Vielzahl genetisch abweichender Genotypen, wobei je nach Zeit und Ort meist ein oder zwei Varianten dominieren.<sup>11,29</sup> Die Spezifität der PCR-Primer variiert teils beträchtlich zwischen den Genotypen. Primer mit hoher Spezifität weisen Virus-RNA bereits in geringen Konzentrationen nach, während weniger spezifische Primer hohe Viruslasten erfordern.<sup>25,71</sup> So wurden für verschiedene PCR-Protokolle Sensitivitäten von 54 bis 100 % für GG I und von 58 bis 85 % für GG II gezeigt.<sup>71</sup> Geeignete Primer sollten ein möglichst breites NV-Spektrum detektieren. Daher sollten Sequenzen aus hochkonservierten Bereichen des Virusgenoms, wie der Übergangsregion von ORF 1 zu ORF 2, als Amplifikationsbereich gewählt werden.<sup>60,67</sup>

Eine weitere Gruppe von Verfahren beruht auf dem Nachweis von Antigenen, in der Regel Kapsidproteinen. Diese sind stabiler als RNA und liegen in höheren Konzentrationen vor als

intakte Viruspartikel.<sup>48</sup> Mit Hilfe von VLPs wurden Enzymimmunoassays, wie Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assays (ELISAs) und immunchromatografische Schnelltests (ICs), entwickelt.<sup>25</sup> ELISAs können Konzentrationen ab  $10^4$  bis  $10^6$  NV-Partikeln pro ml Stuhl nachweisen.<sup>20</sup> ICs detektieren ab  $10^6$  bis  $10^8$  NV-Partikel pro g Stuhl.<sup>72,73</sup> Diese Verfahren sind technisch, zeitlich (4h für ELISAs, 15-30 Min. für ICs) und finanziell weniger aufwendig als die PCR und insbesondere ICs ermöglichen eine umgehende patientennahe Diagnostik, ohne dass teure und aufwändige Technik oder geschultes Personal notwendig sind.<sup>66,69,70,72,74,75</sup> Auch für Enzymimmunoassays ist die Antigenvielfalt zirkulierender NV-Varianten problematisch. So gilt es Antikörper zu finden, die mit einer Vielzahl verschiedener Genotypen interagieren.<sup>25</sup> In der Literatur zeigen diese Verfahren stark schwankende Sensitivitäten und Spezifitäten, die jeweiligen Angaben reichen von <30 bis >70 % und 69 bis 100 % für ELISAs sowie von 35 bis 90 % und 93 bis 100 % für ICs (Tabelle 1).<sup>72,74,76,77</sup>

**Tabelle 1: Übersicht NV-spezifischer immunchromatografischer Schnelltests (ICs)**

IC (Hersteller)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Anzahl und GG-Spezifität verwendeter Antikörper
RIDA <sup>®</sup> QUICK NV (R-Biopharm AG, Deutschland) <sup>69,70,76-80</sup>	52-86	95-100	7 gegen GG I und II (monoklonal)
IP-NV IC-1 Stick kit (Immuno-Probe, Japan) <sup>72,81</sup>	74-79	96-100	GG II.3 und II. 4 (polyklonal)
Immuno Search NV kit (Morinaga Milk Industry, Japan) <sup>72</sup>	75	100	GG I.1, I.11, II.2, II.3, II. 4, II.5, II.6 (polyklonal)
QUICK Ex-NV kit (Denka Seiken, Japan) <sup>75</sup>	55-74	93-99	GG I und II (monoklonal)
Takanashi et al. 2008 <sup>73</sup> (Japan)	70	94	GG II.3 und II.4 (polyklonal)
ImmunoCardSTAT! NV (Meridian Bioscience Europe, Frankreich) <sup>77</sup>	35-82	100	GG I und II
NOROTOP <sup>®</sup> (ALL.DIAG SA, Frankreich) <sup>77</sup>	51-80	100	GG I und II (monoklonal)
SD BIO-LINE NV (Standard Diagnostics, Inc., Korea) <sup>77</sup>	41-90	100	GG I und II

Beeinflusst werden die Sensitivitäten in verschiedenen Studien einerseits von der Zusammensetzung und Menge vorhandener NV in den Proben, aber auch durch die Probenzahl, Präanalytik (Lagerung und Aufarbeitung) sowie die jeweilige Referenzmethode (Tabelle 2).<sup>66,72,74</sup>

**Tabelle 2: Beeinflussung der Testsensitivität durch modifizierte Präanalytik am Beispiel des RIDA® QUICK NV**

RIDA® QUICK NV		untersuchte NV-Varianten		
		Sensitivität (%) [Probenzahl n] <sup>76,77,80</sup>		
		GG I	GG II	GG I + II
Proben	frisch	0 [6]	71; 79 [74; 94]	74 [100]
	gefroren	0; 17; 42 [6; 58; 19]	64; 76; 88 [160; 25; 94]	52; 61; 83 [218; 62; 100]
	alternativer Puffer	0 [6]	61 [94]	67 [100]

Statistische Berechnungen ergaben, dass für die korrekte Identifikation eines NV-bedingten Ausbruchs akuter GE mit einer kumulativen Wahrscheinlichkeit von 90 % die Analyse von mindestens 3 Proben verschiedener Patienten mittels PCR und auf Grund der geringeren Sensitivität 6 Proben mittels ELISA notwendig ist.<sup>82</sup>

Methoden zur Detektion NV-spezifischer Antikörper haben sich bei der hohen Serumprävalenz in der Bevölkerung und dem relativ langen Zeitintervall zwischen Infektion und Serokonversion, definiert als vierfacher Anstieg des Antikörpertiters im Serum, als ungeeignet zur Diagnose einer akuten Infektion erwiesen.<sup>10,20</sup>

Die in der Praxis üblichen Verfahren basieren auf dem Nachweis intakter Viruspartikel, viraler RNA oder Virusantigenen. Stuhlproben unterscheiden sich qualitativ und quantitativ hinsichtlich der in verschiedenen Testverfahren untersuchten Bestandteile, weshalb die Verfahren vielmehr ergänzend als alternativ anzusehen sind.<sup>65,66</sup> Generell sollten Laborbefunde immer in Zusammenschau mit klinischen Symptomen und epidemiologischen Kriterien betrachtet werden.<sup>34,66,82</sup>

### 1.3.6 Therapieoptionen

Da verschiedene Ansätze zur Entwicklung kausaler Therapien bislang nicht erfolgreich waren, wird eine NV-GE symptomatisch behandelt.<sup>11</sup> In schweren Fällen kann eine intravenöse

Rehydratation und Hospitalisierung erforderlich sein.<sup>60</sup> Bei stark ausgeprägter Emesis und Diarrhoe kann der Einsatz von Antiemetika, motilitätshemmenden oder antisekretorisch wirksamen Medikamenten sinnvoll sein.<sup>11</sup> Im Falle einer seltenen, chronischen Infektion bei immunsupprimierten Patienten wird, soweit möglich, eine Reduzierung der immunsuppressiven Therapie empfohlen.<sup>40,43</sup>

### **1.3.7 Prävention**

Die Entwicklung von Impfstoffen auf Basis von VLPs wird durch die ausgeprägte, sich stetig wandelnde Antigenvielfalt und mangelhafte Ausbildung einer Langzeitimmunität limitiert.<sup>22,60</sup>

Eine wirksame Prävention ist nur durch frühzeitige Erkennung einer NV-Infektion und deren Quelle sowie der unverzüglichen Einleitung von Infektionsschutzmaßnahmen möglich.<sup>13,60</sup>

Folgende Hygienemaßnahmen werden empfohlen: Isolierung von erkrankten Personen (gegebenenfalls Kohortenisolierung und -pflege), Tragen von Handschuhen, Schutzkittel und geeignetem Atemschutz, konsequente Händehygiene, sorgfältige Aufklärung Betroffener und Angehöriger, Desinfektion von patientennahen Flächen wie Toiletten, Waschbecken und Türgriffen sowie sorgfältige Lebensmittelhygiene. Erkrankte Personen werden bis mindestens 48 Stunden nach Abklingen der Symptome als kontagiös betrachtet.<sup>20</sup>

In Deutschland sind im Labor nachgewiesene NV-Infektionen seit dem 01.01.2001 nach §7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) meldepflichtig.

### **2. Zielsetzung der Arbeit**

Noroviren (NV) gehören weltweit zu den häufigsten Erregern der akuten nicht-bakteriellen Gastroenteritis (GE). Ihre Eigenschaften, wie die sehr niedrige infektiöse Dosis, die hohe Umweltresistenz und die Ausscheidung auch bei asymptomatischen Personen, begünstigen eine rasche Ausbreitung und das ausbruchartige Auftreten von NV-GE. Ausbrüche mit NV treten bevorzugt in Gemeinschaftseinrichtungen auf. Die Infektion verläuft bei gesunden Personen meist selbstlimitierend, jedoch sind protrahierte, komplikationsreiche Verläufe für vulnerable Patientengruppen beschrieben. Da keine kausale Therapie existiert, erfolgt die Behandlung rein symptomatisch und das primäre Ziel liegt in der frühzeitigen Erkennung und Einleitung von Infektionsschutzmaßnahmen.

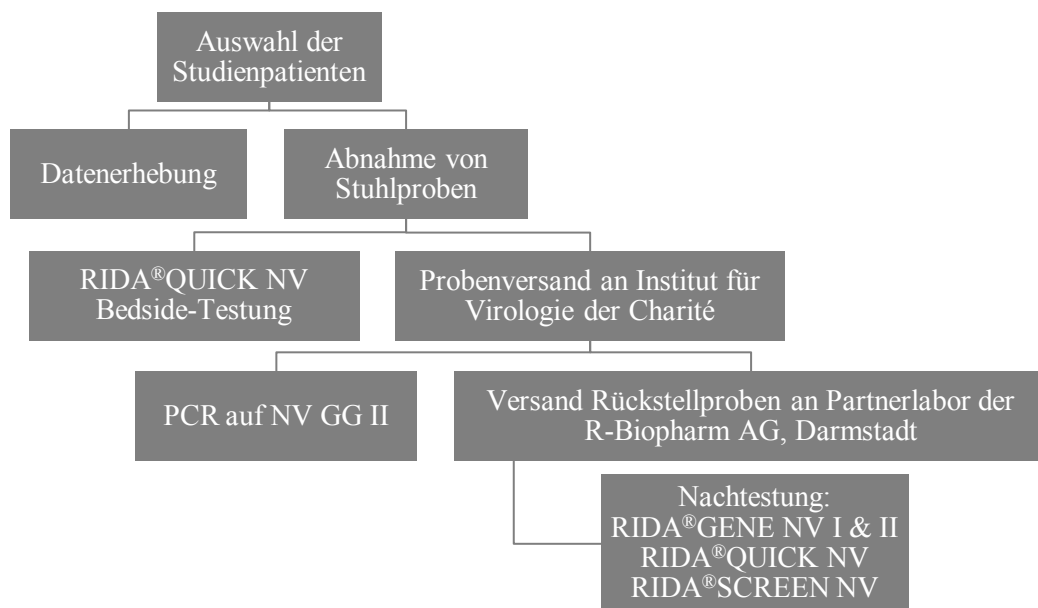
Die Diagnose einer NV-GE kann anhand etablierter Ausbruch- oder Fallkriterien gestellt werden, deren Sensitivität und Spezifität ist jedoch begrenzt und eine Diagnosebestätigung durch geeignete Labortests anzustreben. Als diagnostischer „Goldstandard“ gilt derzeit die real-time PCR zum Nachweis viraler RNA im Stuhl. Dieses Verfahren zeigt eine hohe Sensitivität und Spezifität, ist jedoch kostenintensiv, nicht überall verfügbar und die Testergebnisse liegen nicht zeitnah vor. Spezifische Enzymimmunoassays (ELISA, IC) zum Nachweis von NV-Antigenen sind kostengünstiger, einfacher zu handhaben und rascher durchführbar. Basierend auf Laboruntersuchungen zeigen sie im Vergleich zur PCR eine geringere Sensitivität bei jedoch ausreichend hoher Spezifität. Beim RIDA<sup>®</sup>QUICK NV (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) handelt es sich um einen kommerziell verfügbaren IC-Test, welcher in dieser Arbeit unter realistischen Bedingungen im Klinikalltag mit folgenden Fragestellungen evaluiert wurde:

- Beurteilung der diagnostischen Zuverlässigkeit (u. A. Sensitivität, Spezifität) und Anwendbarkeit der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung zum Nachweis einer NV-GE im Vergleich zum derzeitigen diagnostischen „Goldstandard“, der real-time PCR.
- Evaluation von möglichen Einflussfaktoren auf die Entstehung falsch-positiver und falsch-negativer Testergebnisse der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung.
- Evaluation des Einflusses serieller Testungen von Patienten mit NV-GE und initial negativer RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung auf die diagnostische Sensitivität.
- Bestimmung der diagnostischen Zuverlässigkeit des RIDA<sup>®</sup>QUICK NV in der Diagnose NV-bedingter Ausbrüche mit akuter GE.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Studiendesign

Ziel der Arbeit war die Evaluierung des RIDA<sup>®</sup>QUICK NV (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) als Bedside-Test im Klinikalltag gegenüber der Polymerasekettenreaktion (PCR) im Rahmen einer prospektiven, klinischen Studie. Der Studienplan wurde der Ethikkommission der Charité Berlin vorgelegt und erhielt am 13.01.2010 ein positives Votum (Nummer EA4/009/10). Die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki in der Wintersaison 2010/2011 am Campus Benjamin Franklin der Charité durchgeführt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Studienablaufs**

Für eine Teilnahme kamen alle Patienten >18 Jahre in Frage, die sich im genannten Zeitraum mit plötzlich aufgetretener Übelkeit, Erbrechen und/oder Diarrhoen in der Rettungsstelle des Campus Benjamin Franklin vorstellten oder während ihres stationären Aufenthaltes eine entsprechende Symptomatik entwickelten. Patienten wurden aus der Studie ausgeschlossen, wenn keine schriftliche Einwilligung zur Testdurchführung und Datenerhebung oder Stuhlprobe vor Entlassung eingeholt werden konnte. Die Proben wurden in der Rettungsstelle mittels RIDA<sup>®</sup>QUICK NV untersucht und parallel an das Institut für Virologie der Charité versandt. Rückstellproben wurden nach Abschluss der Patientenrekrutierung an die R-Biopharm AG (Darmstadt, Deutschland) zur Nachtestung und erweiterten Diagnostik (RIDA<sup>®</sup>GENE NV I & II, RIDA<sup>®</sup>QUICK und RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV) versandt. Abbildung 3 zeigt den Studienablauf.

### 3.2 Datenerfassung

Anhand eines standardisierten Fragebogens erfolgte bei Studieneinschluss ein Interview zur Erhebung der Basisdaten und klinischen Symptomatik jedes Patienten. Erfasst wurden demografische Daten, Grunderkrankungen, Immunsuppression und Medikation. Die Patienten wurden zu Auftreten, Dauer und maximaler Anzahl von Erbrechen und Diarrhoe innerhalb von 24 Stunden sowie weiteren Symptomen (Übelkeit, Kopfschmerzen, Bauchschmerzen, und -krämpfe, Blut- oder Schleimbeimengungen im Stuhl) befragt. Alle Symptome wurden fortlaufend bis zum vollständigen Abklingen dokumentiert. Die maximale Körpertemperatur sowie das Körpergewicht bei Aufnahme und Entlassung wurden erfasst. Der klinische Schweregrad wurde mit dem 2001 publizierten Severity Score (siehe Tabelle 3) ermittelt.<sup>35</sup>

**Tabelle 3: Bestimmung des klinischen Schweregrades mittels Severity Score<sup>35</sup>**

Symptome	Graduierung	Punkte
Dauer der Diarrhoe in Tagen	1-4	1
	5	2
	6	3
maximale Anzahl Stühle pro 24 h	1-3	1
	4-5	2
	≥6	3
Dauer von Erbrechen in Tagen	1	1
	2	2
	≥3	3
maximale Anzahl von Episoden mit Erbrechen pro 24 h	1	1
	2-4	2
	≥5	3
maximale Körpertemperatur	≥ 37,5 °C	2
Übelkeit	ja	1
Bauchschmerzen	ja	1
Bauchkrämpfe	ja	1
Blutbeimengung im Stuhl	ja	2
Schleimbeimengung im Stuhl	ja	1
Kopfschmerzen	ja	1
Severity Score	Summe	0-21

Bei dem Severity Score handelt es sich um eine Weiterentwicklung der 1990 entwickelten Vesikari-Skala zur Bestimmung des klinischen Schweregrades von Rotavirus-Infektionen bei Kindern.<sup>37</sup> Hinsichtlich der Ätiologie wurden Umfeld-, Nahrungsmittel- und Reiseanamnese erhoben. Zudem wurden eine vorangegangene Antibiotika-Einnahme sowie die Wohnverhältnisse (betreut/selbstständig) erfragt. Relevante Basislaborparameter (Natrium, Kalium, C-reaktives Protein, Kreatinin, Gesamt-Bilirubin, Alanin- und Aspartat-Aminotransferase,  $\gamma$ -Glutamyltransferase, kleines Blutbild) wurden erfasst.

#### **3.3 Materialgewinnung und -lagerung**

Es wurde mindestens eine Stuhlprobe oder Erbrochenes bei jedem Patienten gewonnen, in zwei Probenröhrchen gegeben und zunächst bei Raumtemperatur gelagert. Je ein Probenröhrchen wurde an das Institut für Virologie der Charité versandt und ein weiteres am gleichen Tag für die RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung verwendet. War vor Studieneinschluss bereits eine Probe an die Virologie versandt worden, erfolgte in einem möglichst kurzen Zeitintervall eine weitere Probengewinnung zur Durchführung des RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Schnelltests. Bei diskrepanten Befunden zwischen der PCR-Untersuchung am Institut für Virologie der Charité und der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung oder bei zweifelhaften Bedside-Testergebnissen (suggestive Klinik bei negativer Bedside-Testung oder nur schwach positiver Befund) wurde die Gewinnung einer weiteren Stuhlprobe am Folgetag für beide Verfahren angestrebt. Erfolgten bei Patienten weitere PCR-Untersuchungen im Verlauf, so wurden die Befunde bei der Auswertung berücksichtigt.

Im Institut für Virologie der Charité wurden die Proben zunächst bei Raumtemperatur gelagert. 50  $\mu$ l einer flüssigen Stuhlprobe oder ein etwa linsengroßes Stück einer festen Stuhlprobe wurden in 1,5 ml physiologische Kochsalzlösung gegeben (Verdünnung etwa 1:20), mittels Vortexer homogenisiert und zentrifugiert (5000 U/min). 140  $\mu$ l des klaren Überstandes wurde für die RNA-Isolierung und folgende PCR verwendet. Der verbleibende Überstand wurde als Rückstellprobe bei -20 °C eingefroren. Die gesammelten Rückstellproben wurden nach Abschluss der Patientenrekrutierung anonymisiert und auf Trockeneis an die R-Biopharm AG versandt und dort am 15.08.2011 mittels RIDA<sup>®</sup>GENE NV I & II sowie bei ausreichender Probenmenge mittels RIDA<sup>®</sup>QUICK NV und RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV nachuntersucht.

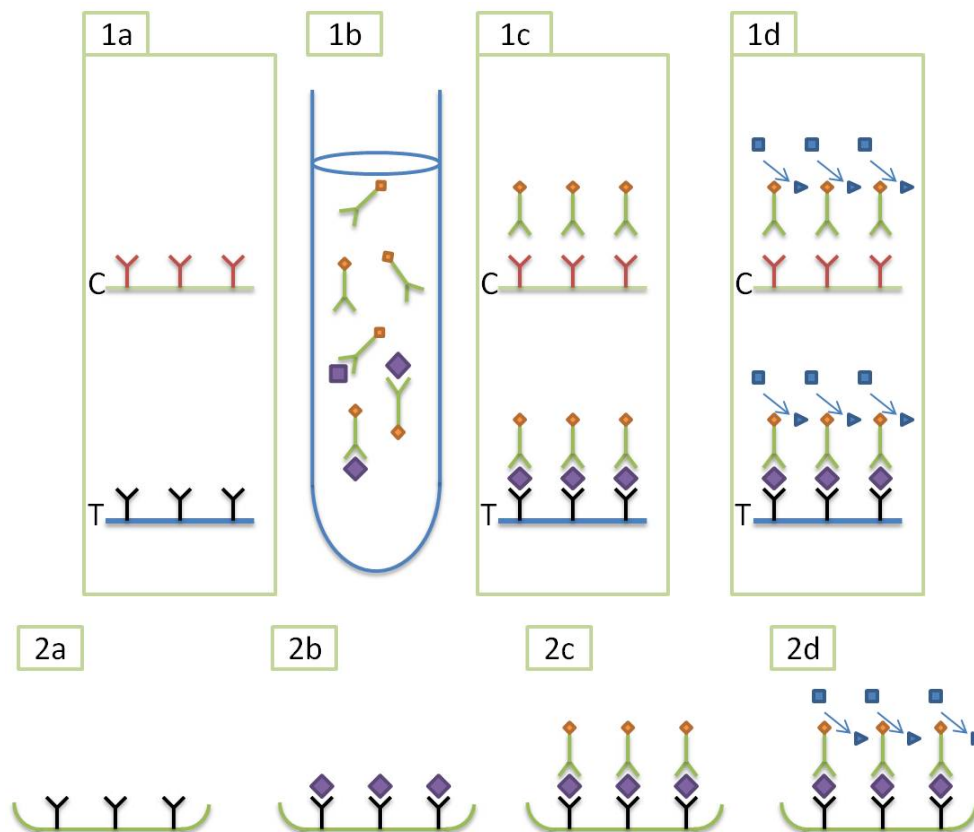
Zusätzlich wurden frische Stuhlproben der Patienten im Rahmen der klinischen Routinediagnostik im virologischen und/oder mikrobiologischen Institut der Charité auf weitere Darmpathogene untersucht. Die Entscheidung hierzu lag bei den betreuenden Ärzten.



### 3.4 Antigennachweis

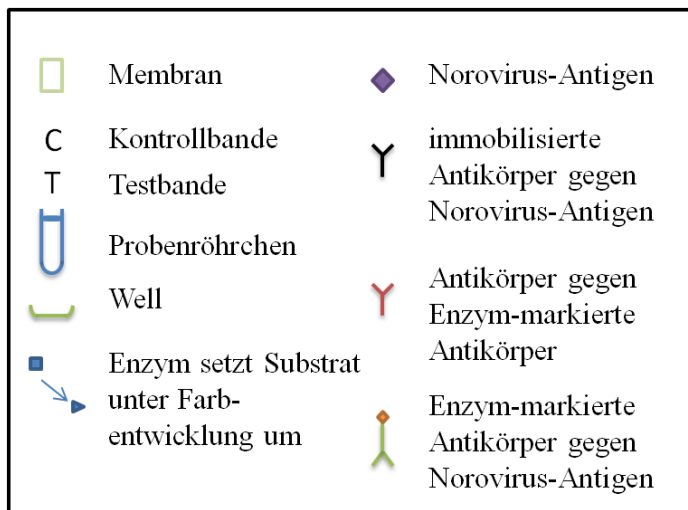
#### 3.4.1 Theoretisches Prinzip von Enzymimmunoassays

Antigene können mittels Enzymimmunoassays direkt im Patientenmaterial nachgewiesen werden. Das Analysenprinzip beruht hierbei auf der spezifischen Bindung zwischen Antigen und Antikörper. Grundlage der Enzymimmunoassays bilden Antikörper, die gegen NV-Antigene, in der Regel Kapsidproteine, gerichtet sind.



**Abbildung 4: Schematisches Testprinzip von Immunchromatografie (1) und ELISA (2)**

**a:** immobilisierte Antikörper an IC-Membran (1) oder Mikrotiter-Well (2)  
**b:** Bindung der Antigene an freie Antikörper in Probensuspension (1) oder immobilisierte Antikörper (2) bei Inokulation im Well **c:** Bindung Enzymmarkierter Antikörper an Antikörpergebundene Antigene via Membran (1) oder im Well **d:** Enzymatische Substratumsetzung mit Farbreaktion



Beim ELISA handelt es sich um die gebräuchlichste Assay-Variante. Abbildung 4: 2a-d zeigt das schematische Testprinzip. Die Auswertung kann rein qualitativ mit dem bloßen Auge oder mittels Extinktionsmessung (E) im Photometer erfolgen. Anhand von Standardkurven der E können Aussagen über die Antigenmenge in der Probe getroffen werden. Die Immunchromatografie (IC) beruht auf dem gleichen Prinzip (Abbildung 4: 1a-d). Die Reaktion findet jedoch an einer Membran, innerhalb einer Testkassette oder als Sticktest, statt. Der Nachweis ist rein qualitativ.

#### **3.4.2 Immunchromatografischer Schnelltest (IC)**

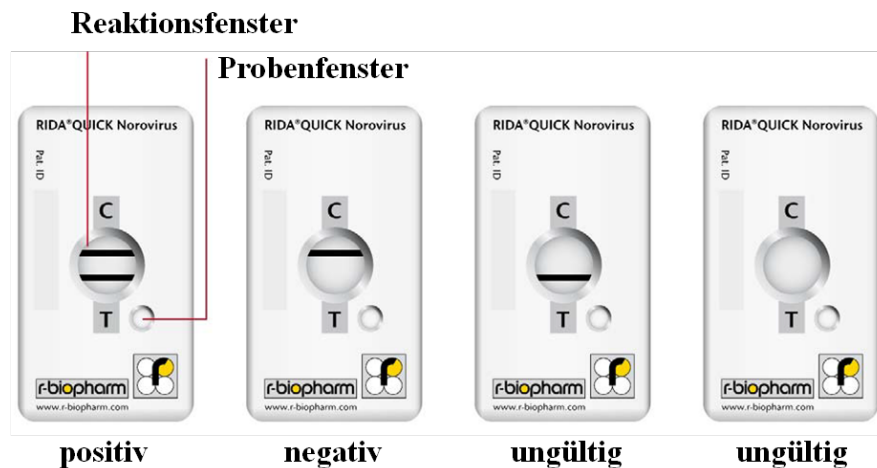
Beim RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Testkit (Artikelnummer: N 1403; R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) handelt es sich um einen mehrstufigen IC zum qualitativen Nachweis von GG I und II NV in humanen Stuhlproben. Der Test basiert auf 7 monoklonalen Antikörpern, welche nach Herstellerangaben NV der Genotypen I.1, I.2, I.3, I.7 sowie II.1, II.2, II.3, II.4, II.5, II.6, II.7, II.10, II.12, II.13, II.14, II.17 erfassen. Kommuniziert wurde zudem eine Nachweisgrenze von  $>5 \times 10^4$  NV-Partikeln pro Probe.

Im Rahmen der Studie wurde der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV zunächst bei allen Patienten als Bedside-Test an frischen Proben durchgeführt. Die Testung erfolgte gemäß der Produktinformation vom 13.11.2009.<sup>78</sup> Es wurden Testkits der Chargen LOT 11080, 11100, 11240, 11420 und 12490 verwendet.

Nach Studienabschluss wurde die Testung im Partnerlabor der R-Biopharm AG in Darmstadt unter standardisierten Laborbedingungen an aufgetauten Rückstellproben wiederholt. Diese wurden 1:2 mit Probenverdünnungspuffer vermischt. Die weitere Testdurchführung erfolgte gemäß Anleitung mit Testkits der Charge LOT 12490.<sup>78</sup>

Jeweils 1 ml Probenverdünnungspuffer wurde mit 100 µl flüssiger oder 50-100 mg fester Stuhlprobe in ein Teströhrchen gegeben. Durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausstoßen mit einer Einwegpipette (Bedside-Testung) oder durch Vortexen (Nachtstellung) wurde eine homogene Suspension hergestellt mit nachfolgender Sedimentation für mindestens 2 Minuten. Der Überstand (250 µl) wurde mit Biotin-gekoppelten Antikörpern (Konjugat 1) versetzt, wobei sich Komplexe aus Antikörpern und potenziell vorhandenem Antigen bildeten (Abbildung 4: 1b). Anschließend wurde das Proben-Konjugat-Gemisch in das Probenfenster der Testkassette gegeben. Auf der Testmembran befand sich die Testbande (T) mit immobilisierten Antikörpern gegen NV-Antigene und die Kontrollbande (C) mit Antikörpern gegen Biotin-gekoppelte Antikörper. Während einer Inkubationszeit von 10 Minuten bildeten sich Antigen-Antikörper-

Komplexe (Abbildung 4: 1c). In das Reaktionsfenster gegebenes Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Konjugat 2) band anschließend an Biotin (1 Minute). Nach einem Waschschrift wurde das chromogene Substrat in das Reaktionsfenster gegeben und durch die immobilisierte Peroxidase umgesetzt, sichtbar durch eine Blaufärbung (Abbildung 4: 1d). Das Testergebnis wurde innerhalb von 3 Minuten abgelesen (Abbildung 5).



**Abbildung 5: RIDA®QUICK NV-Testkassette und mögliche Ergebnisse (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland)**

Die Testung war nur als gültig zu betrachten, wenn es zur Blaufärbung von C kam und konnte jeweils positiv oder negativ ausfallen. Ein Test wurde als positiv gewertet, wenn innerhalb von 6 Minuten eine Blaufärbung von T erfolgte, wobei deren Intensität von schwach bis stark variierte. Andere Verfärbungen der Membran wurden nicht gewertet. Der Test war hingegen negativ, wenn binnen 6 Minuten eine Blaufärbung von C nicht aber von T eintrat. Bei unklarem oder ungültigem Befund wurde die Testung wiederholt.

#### 3.4.3 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA)

Beim RIDA®SCREEN NV 3<sup>rd</sup> Generation (Artikelnummer: C 1401; R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) handelt es sich um einen Sandwich-ELISA zum qualitativen Nachweis von GG I und II NV in humanen Stuhlproben. Wie der IC basiert der ELISA auf 7 monoklonalen Antikörpern, welche nach Herstellerangaben NV der Genotypen I.1, I.2, I.3, I.7 sowie II.1, II.2, II.3, II.4, II.5, II.6, II.7, II.10, II.12, II.13, II.14, II.17 erfassen.

Die Testungen erfolgten im Partnerlabor der R-Biopharm AG in Darmstadt unter standardisierten Laborbedingungen an aufgetauten Rückstellproben. Diese wurden 1:2 mit Probenverdünnungspuffer vermischt. Die weitere Testdurchführung erfolgte gemäß der

Anleitung vom 10.08.2010 mit Testkits der Charge LOT 13151.<sup>83</sup> Das Testergebnis wurde durch Messung der E bei 450 nm im Photometer bestimmt und die Probe anhand eines Cut-off-Wertes ( $= E_{\text{Negativkontrolle}} + 0,15$ ) als jeweils positiv ( $E \geq \text{Cut-off}$ ) oder negativ ( $E < \text{Cut-off}$ ) gewertet.

## 3.5 Nachweis von Norovirus-RNA

### 3.5.1 Theoretisches Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte. Handelt es sich wie bei NV um RNA, wird diese zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die meist 30 bis 40 Reaktionszyklen bestehen aus Hitzedenaturierung des Doppelstranges, „Annealing“ mit Anlagerung spezifischer Primer, welche den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren, und Elongation mit Synthese des komplementären Stranges durch eine DNA-Polymerase. Pro Zyklus wird die DNA verdoppelt. Bei der real-time PCR erfolgt der Nachweis zeitgleich durch Zugabe zunächst inaktiver Fluoreszenzfarbstoffe, welche durch Einbau in die DNA aktiviert werden. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert dabei linear mit der Menge an gebildeter doppelsträngiger DNA. Zur Quantifizierung wird der Ct-Wert (engl. „cycle threshold“) herangezogen. Dieser Zyklusschwellenwert kennzeichnet den Beginn des exponentiellen Anstiegs der Amplifikationskurve. Je mehr Nukleinsäuremoleküle sich in der Probe befinden, desto eher beginnt die exponentielle Phase der Amplifikation und desto niedriger ist der Ct-Wert. Zur Qualitätskontrolle wird eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt.

### 3.5.2 PCR im Institut für Virologie der Charité

Im Institut für Virologie der Charité erfolgte routinemäßig die PCR zum Nachweis von GG II NV. Dafür wurde die virale RNA mit dem QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Die gewonnene RNA aus 140 µl der Probensuspension wurde in 50 µl AVE<sup>®</sup>-Puffer eluiert und mittels SuperScript<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) im Thermocycler GeneAmp PCR-System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) wie folgt in cDNA umgeschrieben: 5 Minuten Primer-Annealing bei 25 °C, 35 Minuten reverse Transkription bei 50 °C, 2 Minuten Inaktivierung bei 96 °C sowie abschließend Kühlung auf 4 °C. Die real-time PCR erfolgte im LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) nach folgendem Schema: 10 Minuten Aktivierung bei 95 °C, 55 Zyklen bestehend aus 10 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 30 Sekunden Annealing bei 60 °C und 10 Sekunden Abkühlung bei 40 °C. Die verwendeten Primer (NO 4:

5'-AGC CAA TGT TCA GAT GGA TG-3' und NO 5: 5'-TCG ACG CCA TCT TCA TTC AC-3') umgrenzten Sequenzen der viralen RNA-Polymerase.<sup>47</sup> Die Sonde (NO 6F: 5'-FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CTG GC-TAMRA -3' nt 5048 -5070) war fluoreszenzmarkiert. Als Positivkontrolle wurden 45 Kopien/ $\mu$ l einer klonierten 378-bp-NV GG II-Sequenz (nt 5007 – 5385), als Negativkontrolle fetales Kälberserum eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen LightCycler Software 4.05 (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland). Die PCR wurde als aussagekräftig bewertet, wenn der Ct-Wert der Positivkontrolle  $\pm$  1,5 dem Mittelwert entsprach und die Negativkontrolle keine Amplifikationskurve zeigte. Die Proben wurden je nach Vorliegen einer Amplifikationskurve als positiv oder negativ für GG II NV gewertet. Die Nachweisgrenze wurde mit 26 RNA-Kopien pro Reaktionsansatz angegeben.

#### **3.5.3 PCR im Partnerlabor der R-Biopharm AG in Darmstadt**

Beim RIDA<sup>®</sup>GENE NV I & II (Artikelnummer: PG 1415; R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) handelt es sich um einen real-time PCR-Kit zum direkten qualitativen, differenzierten Nachweis von GG I und II NV in humanen Stuhlproben. Dieses erfasst gemäß Herstellerangaben die Genotypen I.1, I.2, I.3, I.7 sowie II.1, II.2, II.3, II.4, II.5, II.6, II.7, II.10, II.12, II.13, II.14 und II.17. Die Nachweisgrenze wurde mit  $\leq$ 50 Kopien viraler RNA pro Reaktion angegeben.

Die Testungen erfolgten im Partnerlabor der R-Biopharm AG in Darmstadt unter standardisierten Laborbedingungen an aufgetauten Rückstellproben gemäß der Anleitung vom 11.04.2004 mit Testkits der Charge LOT 14171.<sup>84</sup> Virale RNA wurde mit dem Maxwell<sup>®</sup>16 System (Promega, Fitchburg, USA) aus 150  $\mu$ l der Rückstellprobe extrahiert und in 100  $\mu$ l Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die verwendeten Primer waren modifiziert nach Höhne und Schreier 2006, die genauen Sequenzen sind jedoch unveröffentlicht und unterliegen dem Firmengeheimnis.<sup>67</sup> Die Proben wurden je nach Vorliegen einer Amplifikationskurve als positiv oder negativ für GG I oder II NV gewertet.

#### **3.6 Statistische Auswertung**

Für die erhobenen Basisdaten der Studienteilnehmer wurden die absoluten (n) und relativen (%) Häufigkeiten berechnet. Für alle kontinuierlichen Variablen wurden der Median (*m*) und die Spannweite (*R*) bestimmt. Diese Berechnungen erfolgten mit Microsoft<sup>®</sup> Office Excel<sup>®</sup> 2007 (Microsoft Office Professional Plus 2007, © 2008 Microsoft Corporation, Redmond, USA). Medianwerte wurden mittels Mann-Whitney-U Test mittels GraphPad Prism Software Version

5.02 (© 2002-2012 GraphPad Software Inc., San Diego, USA) verglichen. Bei  $p \leq 0,05$  wurde Signifikanz angenommen.

#### **3.6.1 Probenbezogene Auswertung**

Der Methodenvergleich erfolgte am gesamten Probenumfang. Es wurden jeweils die absoluten ( $n$ ) und relativen (%) Häufigkeiten aller qualitativen Ergebnisse (positiv, negativ) sowie  $m$  und  $R$  der Ct-Werte und E positiver Proben bestimmt.

Die Ergebnisse der PCR auf GG II NV des Institutes für Virologie der Charité und RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG I & II aus dem Partnerlabor der R-Biopharm AG in Darmstadt wurden verglichen. Da der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV den Nachweis von GG I und II NV ermöglicht, wurden die Ergebnisse der GG II PCR des Instituts für Virologie der Charité mit den positiven Ergebnissen des RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG I-Tests in Darmstadt zusammengefasst und als Referenz-PCR definiert. Um methodische Fehler zu reduzieren wurden lediglich Ct-Werte und E GG II-positiver Proben für Medianwertvergleiche herangezogen.

Die Ergebnisse der Antigentests RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung, RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Nachttestung und RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV wurden jeweils in einer Vierfeldertafel der Referenz-PCR gegenüber gestellt. Proben der Bedside-Testung wurden nur einbezogen, wenn sie am gleichen Tag wie die Proben für PCR und Nachttestungen gewonnen wurden. Jede Probe und Bedside-Testung wurde nur einmal gewertet. Anhand der Vierfeldertafeln wurden jeweils die Sensitivität, Spezifität, der positive und negative prädiktive Wert sowie die Übereinstimmung mit der Referenz-PCR berechnet. Die Mediane ( $m$ ) der Ct-Werte und E in den Gruppen der jeweils richtig-positiv und falsch-negativ getesteten GG II-positiven Proben wurden verglichen. Diskrepante und auffällige Befunde sowie Besonderheiten bei der Testdurchführung sind im Ergebnisteil detailliert beschrieben.

#### **3.6.2 Patientenbezogene Auswertung**

Die Bestimmung der diagnostischen Güte der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung gegenüber der Referenz-PCR erfolgte an 65 Studienpatienten. Dabei wurde pro Patient je ein Befund der Bedside-Testung und der Referenz-PCR gewertet. Erfolgten mehrere Testungen pro Patient, wurden die jeweils zu wertenden Befunde für PCR und Bedside-Testung wie folgt ausgewählt: Waren die Befunde konstant, wurde jeweils die initiale Testung gewertet, bei Diskrepanz unabhängig vom Abnahmezeitpunkt immer der erste NV-positive Befund; bei gleichem Abnahmedatum wurden Befunde von Stuhlproben Erbrochenem vorgezogen.

Anhand einer Vierfeldertafel wurden die Sensitivität, Spezifität, der positive und negative prädiktive Wert, die Übereinstimmung sowie die Prävalenz in der Studienpopulation berechnet. Die Gruppe der richtig-positiv und falsch-negativ eingeschätzten Patienten wurde hinsichtlich absoluter (n) und relativer (%) Häufigkeiten klinischer Symptome gegenübergestellt und zudem jeweils die Mediane (m) des Severity Score, der Anzahl der Tage zwischen Symptombeginn und Durchführung der Bedside-Testung, der Ct- und E-Werte verglichen. Dabei wurden lediglich Ct-Werte und E GG II NV-positiver Proben einbezogen, bei denen die Probengewinnung für die gewertete Bedside-Testung und Referenz-PCR am selben Tag erfolgt war. Diskrepanze und auffällige Befunde sind im Ergebnisteil detailliert beschrieben.

#### **3.6.3 Bestimmung der Testzuverlässigkeit in Ausbruchssituationen**

Analog zur Publikation von Duizer *et al.* wurde die minimale Anzahl positiv zu testender Patienten (s) einer Stichprobe (n) bestimmt, um einen NV-bedingten Ausbruch akuter GE mit hinreichend statistischer Zuverlässigkeit durch einen Test zu detektieren.<sup>82</sup> Unter der Voraussetzung, dass die obere Grenze der Prävalenz NV-positiver Stuhlbeefunde in der Gesamtbevölkerung 8 % beträgt, wurde ein Ausbruch als NV-bedingt angenommen, wenn die Prävalenz positiver Befunde bei den untersuchten Patienten >8 % lag. Duizer *et al.* berechneten die minimale Anzahl positiver Befunde für einen hypothetischen Goldstandard mit einer Sensitivität (se) und Spezifität (sp) von 1 sowie basierend auf Literaturangaben für PCR-Testungen (se=0,72; sp=0,99) und ELISA (se=0,41; sp=0,98). Es wurde vorausgesetzt, die Anzahl NV-positiver Befunde (s) in einem Probenumfang (n) sei binominal (n, p) verteilt, jede Testung könne bei festgelegtem n lediglich positiv oder negativ ausfallen, sei unabhängig und die Erfolgswahrscheinlichkeit eines Ergebnisses konstant. Die Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Prävalenz (p) erfolgte dabei mit hypothetischen Daten für n ( $1 < n < 21$ ) und s unter Verwendung der BINOMVERT-Funktion in Excel [ $s; n; (p * se + (1 - p) * (1 - sp));$  FALSCH]. Die minimale Anzahl positiver Proben, die notwendig sind um einen NV-bedingten Ausbruch zu erkennen, wurde definiert als die Probenzahl, ab der die Prävalenz NV-positiver Befunde mit einer >95 %-igen Wahrscheinlichkeit  $\geq 8$  % liegt.

Anschließend wurde die kumulative Wahrscheinlichkeit bestimmt, in einer Stichprobe (n) die Mindestzahl an positiven Proben tatsächlich zu detektieren. Dabei wurde basierend auf Literaturangaben zur PCR angenommen, die Nachweisbarkeit (p) von NV in Stuhlproben eines Ausbruchs betrage 84 %.

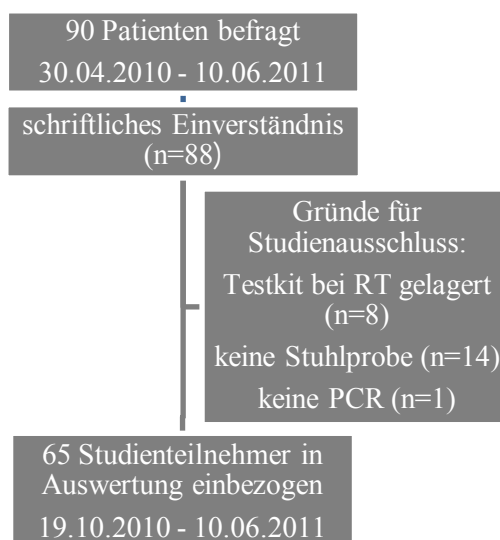
Analog erfolgten die Berechnungen für die RIDA<sup>®</sup> QUICK NV Bedside-Testung basierend auf den Werten der patientenbezogenen Auswertung (Variante A). Zum Ausschluss methodischer Fehler durch die Auswahl der zu wertenden Befunde wurden zudem Sensitivität und Spezifität gegenüber der Referenz-PCR bestimmt, wenn je Patient nur die initial getestete Stuhlprobe gewertet wurde, ohne Berücksichtigung von Nachtestungen und Erbrochenem (Variante B).



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Studienverlauf

Im Zeitraum vom 30.04.2010 bis zum 10.06.2011 wurden insgesamt 90 Patienten am Campus Benjamin Franklin der Charité über die Studie aufgeklärt und nach ihrer Bereitschaft zur Teilnahme befragt. 88 Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis. Bei 14 dieser 88 Patienten konnte vor Entlassung keine Stuhlprobe gewonnen werden und bei einer Patientin war keine Probe im Institut für Virologie der Charité verfügbar. Zudem wurden 8 weitere Patienten nicht in die Auswertung einbezogen, da das verwendete RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Testkit nicht bei 2 bis 8 °C sondern bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde. Somit standen insgesamt 65 Patienten für die Auswertung zur Verfügung (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Flussdiagramm zur Auswahl der Studienteilnehmer (n)**

### 4.2 Studienpopulation

Die basisdemografischen Daten der insgesamt 65 auswertbaren Studienpatienten mit einem medianen Alter von 70 Jahren sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 5 und Tabelle 6 geben einen Überblick über die klinische Symptomatik sowie die durchgeführte Diagnostik der insgesamt 35 Männer und 30 Frauen. Bei einer medianen Symptombdauer von 3 Tagen und einem Severity Score von 9 wurden bei 32 (49 %) der 65 Studienteilnehmer Noroviren mittels Referenz-PCR nachgewiesen.

**Tabelle 4: Basisdaten der Studienpatienten**

		<b>Patienten (n=65)</b>
<b>Geschlecht</b> [n (%)]	männlich : weiblich	35 (54) : 30 (46)
<b>Alter in Jahren</b> [ <i>m</i> ( <i>R</i> )]		70 (20-96)
<b>Grunderkrankungen</b> [n (%)]	keine	8 (12)
	kardiovaskulär	26 (40)
	Diabetes mellitus	3 (5)
	hämato-onkologisch	12 (18)
	autoimmun	5 (8)
	sonstige*	11 (17)
<b>Immunsuppressive Therapie</b> [n (%)]		14 (22)

\*sonstige Grunderkrankungen: Leberzirrhose (1), chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (1), Nierentransplantation (2), dialysepflichtige Niereninsuffizienz (2), chronisch-idiopathische Enteroparese (1), Hydrozephalus occlusus (1), Neuropathie (1), Spondylodiszitis (2), Instabilität bei Spondylose (1)

**Tabelle 5: Klinische Symptomatik der Studienpatienten**

		<b>Patienten (n=65)</b>
<b>Falldefinition nach Lopman et al. erfüllt</b> <sup>34</sup> [n (%)]		62 (95)
<b>klinischer Schweregrad als Severity Score</b> <sup>35</sup> [ <i>m</i> ( <i>R</i> )]		9 (2-18)
<b>Symptome</b> [n (%)]	Erbrechen + Diarrhoe	38 (58)
	nur Diarrhoe	26 (40)
	nur Erbrechen	1 (2)
	Übelkeit	49 (75)
	Körpertemperatur $\geq 37,5$ °C	33 (51)
	Bauchschmerzen	33 (51)
	Bauchkrämpfe	26 (40)
	Kopfschmerzen	20 (31)
	Schleimbeimengung im Stuhl	8 (12)
	Blutbeimengung im Stuhl	2 (3)
<b>Symptombdauer in Tagen</b> [ <i>m</i> ( <i>R</i> )]		3 (1-25*)
<b>Tage von Symptombeginn bis Bedside-Testung</b> [ <i>m</i> ( <i>R</i> )]		1 (0-19)

\*bei einer Patientin mit chronischer Diarrhoe wurden die Symptome über 25 Tage dokumentiert und waren beim letzten Kontakt noch vorhanden (Pat.29)

**Tabelle 6: Anamnese und weiterführende Diagnostik**

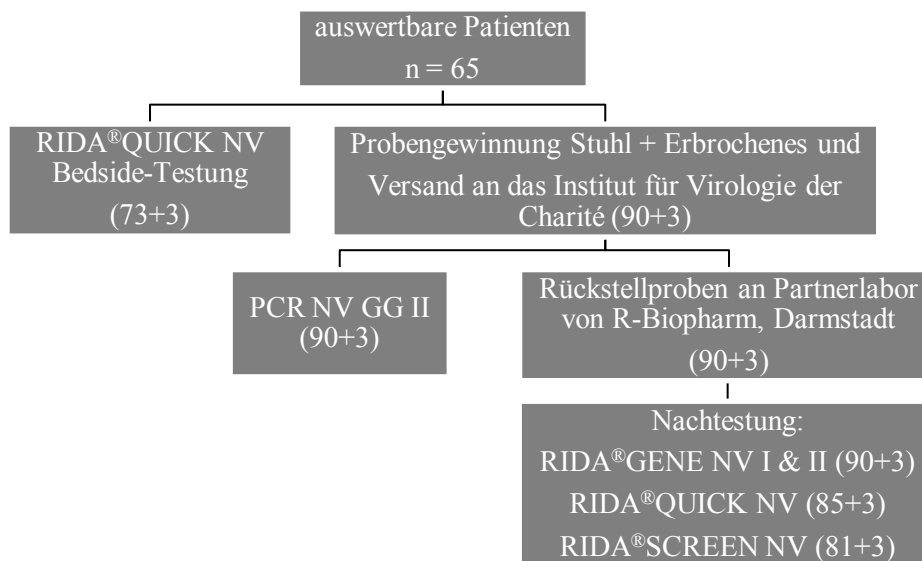
	<b>Patienten (n=65) [n (%)]</b>
<b>Infektionsweg</b> [ambulant : nosokomial]	36 (55) : 29 (45)
<b>Umfeldanamnese positiv</b> [ambulant : nosokomial]	10 (15) : 20 (31)
<b>Reiseanamnese positiv</b>	2 <sup>a</sup> (3)
<b>Zufuhr suspekter Nahrungsmittel in vorangegangenen 24h</b>	8 (12)
<b>vorangegangene Antibiotika-Einnahme</b>	22 (34)
<b>positiver Norovirus-Nachweis in der Referenz-PCR</b>	32 (49)
<b>durchgeführte Diagnostik auf weitere Darmpathogene</b>	54 (83)
Clostridium difficile Toxin A/B	37 (57)
enteropathogene Bakterien	35 (54)
Rotaviren/ Adenoviren	10 (15)/ 6 (9)
Parasiten/ Pilze	1 (2)/ 2 (3)
<b>davon positive Befunde</b>	
Clostridium difficile Toxin A/B	2 <sup>b</sup> (3)
Campylobacter jejuni	1 (1)
Rotaviren	2 (3)

<sup>a</sup> Aufenthalt in Thailand bis 2 Tage (Pat.3) bzw. Kambodscha/ Vietnam bis 6 Tage (Pat.43) vor Symptombeginn

<sup>b</sup> davon eine Koinfektion mit Norovirus (Pat.60)

### 4.3 Methodenvergleich und probenbezogene Auswertung

Von jedem Patienten wurden jeweils 0 bis 19 Tage ( $m=1$  Tag) nach Symptombeginn 1 bis 4 Proben für die RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung bzw. das Institut für Virologie der Charité gewonnen. Insgesamt erfolgten 76 Bedside-Testungen an 73 frischen Stuhlproben und 3 Proben Erbrochenem der 65 Studienpatienten. Im Institut für Virologie der Charité standen 90 Stuhlproben und 3 Proben Erbrochenes der 65 Studienpatienten für die GG II NV-PCR zur Verfügung. Rückstellproben dieser 93 Proben wurden an das Partnerlabor der R-Biopharm AG in Darmstadt versandt und mit der hauseigenen PCR RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG I & II analysiert. Die Mengen der 93 Proben genügten zur Nachtestung von 88 Rückstellproben mit RIDA<sup>®</sup>QUICK NV und 84 mit RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV. Abbildung 7 und Tabelle 7 zeigen einen Überblick über die erfolgten Testungen, die Befundhäufigkeiten und semiquantitativen Aussagen (PCR, ELISA). Die Einzelbefunde aller 93 Proben sind im Anhang (Datentabelle A) gelistet.



**Abbildung 7: Übersicht der im Rahmen der Studie gewonnenen und mit den jeweiligen Testverfahren analysierten Patientenproben aus Stuhl + Erbrochenem (n)**

**Tabelle 7: Befundhäufigkeiten der verschiedenen Testverfahren**

Methoden	Probenzahl Stuhl + Erbrochenes (n)	jeweils positive Befunde in Stuhl + Erbrochenem [n (%)]	semiquantitative Aussagen positiver Proben [m (R)]
RIDA®QUICK NV Bedside-Testung	73+3	21+1 (29+33)	-
PCR GG II NV, Institut für Virologie, Charité	90+3	41+3 (46+100)	Ct-Wert 24,395 (16,78- 39,19) <sup>a</sup>
RIDA®GENE NV GG I&II, R-Biopharm AG in Darmstadt	90+3	GG I: 3+0 (3+0) GG II: 38+2 (42+67)	Ct-Wert GG I: 21,67 (17,45-25,21) <sup>b</sup> Ct-Wert GG II: 30,64 (20,93-38,8) <sup>b</sup>
RIDA®QUICK NV Nachtestung	85+3	26+2 (31+67)	-
RIDA®SCREEN NV Nachtestung	81+3	27+1 (33+33)	E GG I: 0,725 E GG II: 3,7895 (0,206-4,095) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Ct-Werte der Positivkontrollen  $m=33,63$  ( $R$  32,8-35,47)

<sup>b</sup> Ct-Werte der Positivkontrollen 27,5 (GG I) und 28,8 (GG II)

<sup>c</sup> Extinktion (E) der Positivkontrolle 3,955, Cut-off-Bereich : 0,184-0,224

Der Ergebnisvergleich beider PCR-Verfahren zeigte eine Übereinstimmung von 88 % (82/93 bzw. 79/90 bei nur GG II-positiven Proben). Der Median des Ct-Wertes aller GG II NV-positiven Befunde der insgesamt 93 Proben war mit 24,395 im Institut für Virologie der Charité geringer als jener der RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG II Nachttestung (30,64).

Bei 11 (12 %) der 93 Proben zeigten sich divergente PCR-Befunde. Fünf dieser 11 Proben waren in der GG II NV-PCR im Institut für Virologie der Charité negativ, zeigten hingegen im RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG I & II der R-Biopharm AG in Darmstadt ein positives Ergebnis. Bei 3 dieser 5 Proben lag ein NV GG I vor (Proben 4, 84, 92). Diese 3 Proben zeigten sich in der GG II NV-PCR (Institut für Virologie der Charité und RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG II) sowie in der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside- und Nachttestung negativ. Die Testung mittels RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV erfolgte an 2 dieser 3 Proben mit jeweils positivem und negativem Befund. Die übrigen 2 der 5 Proben zeigten konsistent positive Befunde beim RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG II (Ct= 28,38; 32,71), der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Nachttestung und RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV (E=0,651; 1,558), während die RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung jeweils einmal positiv und negativ ausfiel (Proben 60, 78).

Bei den verbleibenden 6 der 11 PCR-diskrepanten Proben war die GG II NV-PCR im Institut für Virologie der Charité positiv (Ct:  $m=36,015$ ;  $R=22,34-37,67$ ) bei negativem RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG I & II. Es handelte sich um 5 Stuhlproben (Proben 12, 33, 61, 82, 87) sowie 1 Probe Erbrochenes (Probe 38). Die erfolgten Antigentests [RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung (n=4) und Nachttestung (n=5) sowie RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV (n=5)] waren konsistent negativ.

Bei 3 der 93 Proben handelte es sich um Erbrochenes, wobei diese 3 Proben für Bedside-Testung und PCR jeweils zeitgleich gewonnen wurden. Eine dieser 3 Proben wurde konsistent mit RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung, GG II NV-PCR des Instituts für Virologie der Charité (Ct=16,78) sowie RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG II (Ct=25,16), RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Nachttestung und RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV (E=3,863) positiv getestet (Probe 42). Die 2 weiteren Proben Erbrochenes waren mittels RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung negativ, in der GG II NV-PCR des Instituts für Virologie hingegen positiv (Ct=27,30; 36,73). Eine dieser Proben wurde mit RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG II (Ct=29,93) und RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Nachttestung positiv getestet (Probe 6), die zweite Probe jeweils negativ (Probe 12). Beide Proben waren mit RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV negativ.

Drei (Proben 20, 61, 70) der insgesamt 93 Proben wurden aus Ileostomata gewonnen, wobei der Bedside-Testung nur bei 2 der 3 Proben eine Referenz-PCR mit jeweils falsch-negativem (Probe 61, Ct=35,74) bzw. richtig-negativem Befund (Probe 20) gegenüberstand. Beide Proben waren in den Nachttestungen mit allen drei Verfahren konsistent negativ.

Der Vergleich der Antigentests erfolgte gegenüber der Referenz-PCR, definiert als Zusammenschau der GG II NV-PCR des Instituts für Virologie der Charité und der GG I-positiven Befunde des RIDA®GENE NV der R-Biopharm AG in Darmstadt, bezogen auf den jeweils gesamten Probenumfang (Tabelle 8). Für die RIDA®QUICK NV Bedside-Testung sowie die standardisierte RIDA®QUICK NV Nachttestung und RIDA®SCREEN NV berechneten sich Sensitivitäten von 44, 56 und 61 % sowie Spezifitäten von 95, 91 und 93 % gegenüber der Referenz-PCR (Tabelle 9).

**Tabelle 8: Befundhäufigkeiten (n) der Antigentests im Vergleich zur Referenz-PCR**

		RIDA®QUICK NV Bedside-Testung (n=73)		RIDA®QUICK NV Nachttestung (n=88)		RIDA®SCREEN NV Nachttestung (n=84)	
		positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
<b>Referenz-PCR</b>	positiv	16	20	24	19	25	16
	negativ	2	35	4	41	3	40

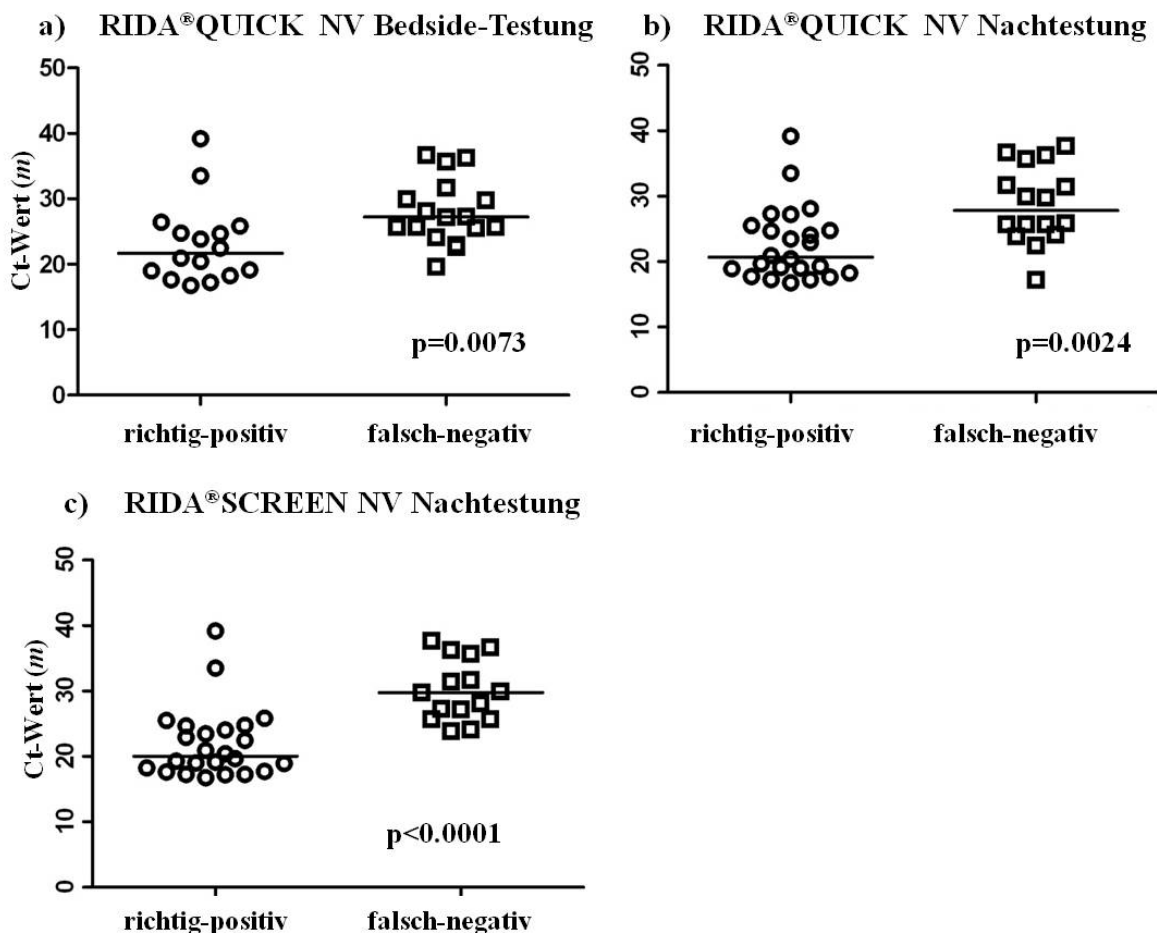
**Tabelle 9: Diagnostische Gütekriterien der Antigentests gegenüber der Referenz-PCR**

	RIDA®QUICK NV Bedside-Testung [% (n=73)]	RIDA®QUICK NV Nachttestung [% (n=88)]	RIDA®SCREEN NV Nachttestung [% (n=84)]
Sensitivität	44,4 (16/36)	55,8 (24/43)	60,98 (25/41)
Spezifität	94,6 (35/37)	91,1 (41/45)	93,0 (40/43)
Pos. prädiktiver Wert	88,9 (16/18)	85,7 (24/28)	89,3 (25/28)
Neg. prädiktiver Wert	63,6 (35/55)	68,3 (41/60)	71,4 (40/56)
Übereinstimmung	69,9 (51/73)	73,9 (65/88)	77,4 (65/84)

Tabelle 10 und Abbildung 8 a-c zeigen den Vergleich der drei Antigentestungen hinsichtlich der Ct-Werte der Referenz-PCR bezogen auf die jeweils richtig-positiv und falsch-negativ getesteten Proben Gruppen. Die jeweiligen Medianwertvergleiche der Ct-Werte in diesen Proben Gruppen zeigten sowohl bei der RIDA®QUICK NV Bedside-Testung ( $p=0,0073$ ) als auch der RIDA®QUICK NV Nachttestung ( $p=0,0024$ ) und dem RIDA®SCREEN NV ( $p<0,0001$ ) signifikant höhere Werte der falsch-negativ getesteten Proben Gruppen.

**Tabelle 10: Medianwertvergleich der Ct-Werte GG II-positiver Befunde in den Gruppen der jeweils richtig-positiv und falsch-negativ getesteten Patienten**

		<b>RIDA® QUICK NV Bedside-Testung</b>	<b>RIDA® QUICK NV Nachtstung</b>	<b>RIDA® SCREEN NV Nachtstung</b>
<b>Ct</b>	richtig-positiv	21,7 (16, 8-39,2)	20,7 (16,8-39,2)	20,4 (16,8-39,2)
<b>[m(R)]</b>	falsch-negativ	26,5 (19,7-36,7)	25,9 (17,3-37,7)	28,9 (23,8-37,7)
<b>Mann-Whitney-U-Test</b>		p=0,0073	p=0,0024	p<0,0001



**Abbildung 8 a-c: Medianwertvergleich der Ct-Werte in den Gruppen der mittels RIDA® QUICK NV Bedside-Testung (a) und Nachtstung (b) sowie RIDA® SCREEN NV (c) richtig-positiv und falsch-negativ getesteten GG II-positiven Proben**

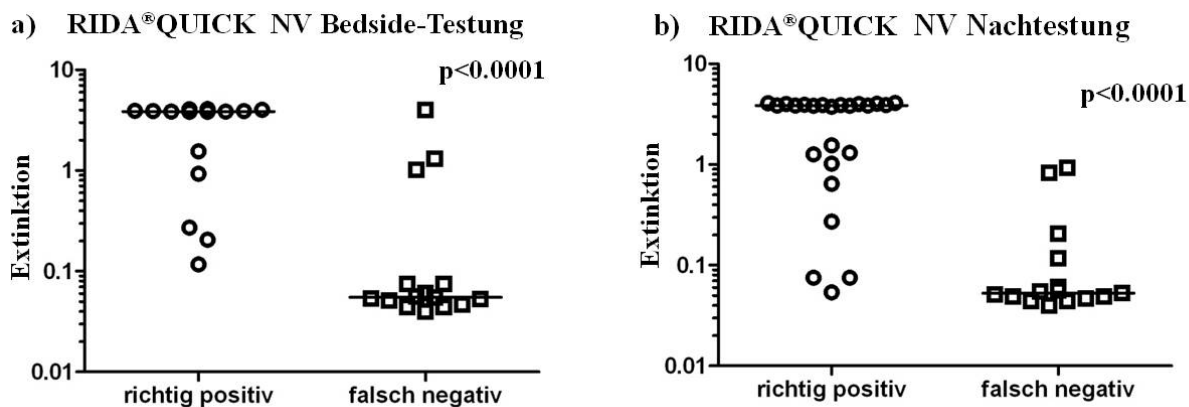
Der Medianwertvergleich der Extinktion in den jeweils mit RIDA® QUICK NV Bedside-Testung und Nachtstung falsch-negativen und richtig-positiven GG II-positiven Proben, welche ebenfalls mit RIDA® SCREEN NV untersucht wurden, zeigte für beide Testungen signifikant

höhere Werte bei den richtig-positiv getesteten Probengruppen ( $p < 0,0001$ ). (Tabelle 11 und Abbildung 9 a+b)

**Tabelle 11: Medianwertvergleich der Extinktion GG II-positiver Befunde in den Gruppen der jeweils richtig-positiv und falsch-negativ getesteten Patienten**

	RIDA <sup>®</sup> QUICK NV Bedside-Testung	RIDA <sup>®</sup> QUICK NV Nachtstestung
E* richtig-positiv	3,858 (0,117-4,095) <sup>a</sup>	3,851 (0,054-4,095) <sup>b</sup>
[m(R)] falsch-negativ	0,055 (0,040-3,985) <sup>a</sup>	0,053 (0,040-0,928) <sup>a</sup>
Mann-Whitney-U-Test	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$

\* Auswertung bezogen auf GG II-positive Proben, welche jeweils  $\pm 24$  Stunden für die Bedside-Testung und Referenz-PCR gewonnen und zudem mittels RIDASCREEN NV untersucht wurden <sup>a</sup>(n=15) <sup>b</sup>(n=24)



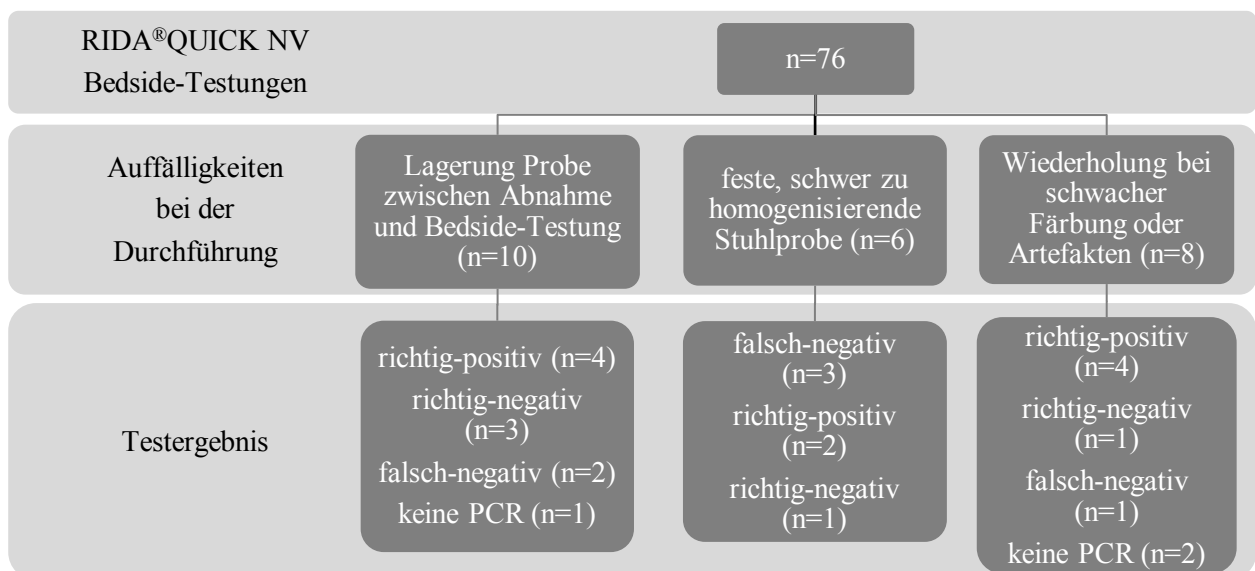
**Abbildung 9 a+b: Medianwertvergleich der Extinktion (RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV) in den Gruppen der mittels RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung (a) und Nachtstestung (b) richtig-positiv und falsch-negativ getesteten GG II-positiven Proben**

Die RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung erfolgte an insgesamt 73 frischen Stuhlproben sowie 3 Proben Erbrochenem der 65 Studienpatienten. Es handelte sich bei 67 (88 %) der 76 Proben um Patientenmaterial, welches gleichzeitig oder innerhalb eines Zeitintervalls von wenigen Stunden wie die Proben für das Institut für Virologie gewonnen wurde. Fünf Stuhlproben der insgesamt 76 Bedside-Testungen wurden 1 Tag nach korrespondierender Probenabnahme für die PCR gewonnen. Verglichen mit der Referenz-PCR waren die Bedside-Testungen dieser 5 Proben richtig-positiv (n=3), richtig-negativ (n=1) und falsch-positiv (n=1) für GG II NV getestet worden. Eine weitere Stuhlprobe wurde 4 Tage nach der PCR-Probe gewonnen und dieser gegenüber richtig-positiv getestet (Pat. 8). An 2 weiteren der insgesamt 76 Proben erfolgte



lediglich die Bedside-Testung, welche jeweils verglichen mit Bedside-Testung und Referenz-PCR an Proben derselben Patienten (Pat. 36+51) vom Folgetag richtig-positiv waren.

Die Durchführung einer Bedside-Testung dauerte 15 bis 20 Minuten, wobei 68 (89 %) der 76 Bedside-Testungen durch dieselbe Person vorgenommen wurden. An den übrigen 13 Bedside-Testungen waren 4 weitere Personen beteiligt. Die Durchführung war unkompliziert. Die Tester kommunizierten Schwierigkeiten bei der exakten Einhaltung der Zeitintervalle auf Grund paralleler Tätigkeiten im Klinikalltag. Auffälligkeiten bei der Bedside-Testung wurden nur zum Teil dokumentiert. Die Befunde wurden jeweils der Referenz-PCR gegenübergestellt, wenn es sich um Proben desselben Tages handelte. (Abbildung 10)



**Abbildung 10: Auffälligkeiten bei Durchführung der insgesamt 67 RIDA®QUICK NV Bedside-Testungen**

Die RIDA®QUICK NV Bedside-Testung erfolgte bei 66 (87 %) der 76 Proben unmittelbar bis wenige Stunden nach Probenabnahme. Zehn (13 %) der 76 Proben wurden vor Testung über Nacht gelagert. Die Bedside-Testungen am nächsten Tag waren gegenüber der Referenz-PCR richtig-positiv (n=4), richtig-negativ (n=3) und falsch-negativ (n=2) für GG II NV und eine Stuhlprobe wurde 4 Tage nach der PCR-Probe gewonnen und war gegenüber dieser richtig-positiv bewertet worden (Pat. 8). Bei den 2 falsch-negativ getesteten Proben handelte es sich jeweils um Stuhl und Erbrochenes derselben Patientin (Pat. 38).

Bei 6 der 76 Bedside-Testungen wurden feste, schwer zu homogenisierende Stuhlproben beschrieben. Diese 6 Bedside-Testungen waren falsch-negativ (n=3), richtig-positiv (n=2) sowie

richtig-negativ (n=1) gegenüber der Referenz-PCR. Von den 3 falsch-negativen Proben handelte es sich bei einer um GG I NV (Probe 84), die 2 verbleibenden waren mittels RIDA®GENE NV GG II positiv, RIDA®SCREEN NV negativ und RIDA®QUICK NV Nachtestung positiv (Probe 3) bzw. negativ (Probe 82).

Acht (11 %) der 76 Bedside-Testungen wurden an den gleichen Proben wiederholt, da aufgrund schwacher Bandenfärbung oder Artefakten im Reaktionsfenster der Testkassette (Verfärbungen außerhalb der zu erwartenden Banden C und T), insbesondere bei verspätetem Ablesen, Unsicherheit hinsichtlich der Befundinterpretation bestand. Bei 6 dieser 8 Proben bestätigte sich das Ergebnis in der zweiten Durchführung als richtig-positiv (n=4), falsch-negativ (n=1) und richtig-negativ (n=1). Eine weitere der 8 Proben zeigte zweifach eine schwach-positive Bedside-Testung ohne dass eine PCR erfolgte, wobei eine Stuhlprobe derselben Patientin vom Folgetag mit Bedside-Testung und Referenz-PCR positiv war (Pat. 36). Die letzte der 8 wiederholt getesteten Stuhlproben wurde 4 Tage nach der PCR-positiven Probe (Ct=17,25) gewonnen, es zeigten sich bei beiden Bedside-Testungen Artefakte. Bei subjektiv zunächst positivem, dann negativem Befund wurde die Probe als Bedside-positiv gewertet (Pat. 8).

Insgesamt wurde bei 11 (69 %) der 16 richtig-positiven Bedside-Testungen eine schwache Färbung der Testbande dokumentiert. Es wurden keine richtungsweisenden Unterschiede hinsichtlich der Ct-Werte der Referenz-PCR ( $m=20,92$ ;  $R=16,78-33,50$ ) sowie Extinktionen ( $m=3,8535$ ;  $R=0,206-4,095$  bei  $n=10$ ) verglichen mit den 5 deutlich gefärbten Proben (Ct:  $m=22,47$ ;  $R=19,14-39,19$  bzw. E:  $m=3,858$ ;  $R=0,117-3,928$ ) beobachtet. Bei der RIDA®QUICK NV Nachtestung war die Testbande bei 4 (17 %) von insgesamt 24 richtig-positiven Proben nur schwach gefärbt, es wurden höhere Ct-Werte der Referenz-PCR ( $m=27,265$ ;  $R=23,47-28,09$ ) und geringere Extinktionen ( $m=0,075$ ;  $R=0,054-0,644$ ) gegenüber den 20 deutlich gefärbten Proben (Ct:  $m=19,495$ ;  $R=16,78-39,19$  und E:  $m=3,863$ ;  $R=0,271-4,095$ ) beobachtet.

### 4.4 Patientenbezogene Auswertung

Zur Evaluierung der diagnostischen Güte des RIDA®QUICK NV als Bedside-Test im Klinikalltag wurden die Befunde bezogen auf die 65 Studienpatienten betrachtet. Die gewerteten Befunde von RIDA®QUICK NV Bedside-Testung und Referenz-PCR (bei mehrfacher Testung jeweils positiver Befund, bei identischen Befunden jeweils initiale Testung, bei gleichem Datum vorzugsweise Stuhlprobe) sind in Tabelle 12 dargestellt. Bei 49 (75 %) der 65 Patienten stimmten die Ergebnisse beider Methoden überein. Die Sensitivität und Spezifität der Bedside-Testung betrug 53 und 97 % (Tabelle 13). Die Prävalenz von NV-Infektionen in der

Studienpopulation lag bei 49 % (32/65). Sämtliche Befunde der 65 Studienpatienten sind im Anhang (Datentabelle B) einzusehen.

**Tabelle 12: Patientenbezogene Ergebnisse [n (%)] der RIDA®QUICK NV Bedside-Testung und Referenz-PCR**

		Bedside-Testung [n (%)]		
		positiv	negativ	
Referenz-PCR [n (%)]	positiv	17 (26)	15 (23)	32 (49)
	negativ	1 (2)	32 (49)	33 (51)
		18 (28)	47 (72)	65 (100)

Tabelle 13: Diagnostische Güte der RIDA®QUICK NV Bedside-Testung

Kriterium	Bedside-Test [% (n=65)]
Sensitivität	53,1 (17/32)
Spezifität	97,0 (32/33)
Positiver prädiktiver Wert	94,4 (17/18)
Negativer prädiktiver Wert	68,1 (32/47)
Übereinstimmung	75,4 (49/65)

Die jeweils gewerteten Proben für RIDA®QUICK NV Bedside-Testung und Referenz-PCR wurden 0 bis 19 Tage nach Symptombeginn ( $m=1$  Tag) gewonnen. Alle 65 gewerteten Bedside-Testungen erfolgten an Stuhlproben. Bei 2 der 65 gewerteten PCR-Proben handelte es sich um Erbrochenes (Pat. 19, 20). Die gewerteten Befunde von Bedside-Testung und Referenz-PCR stammten bei 52 (80 %) der 65 Patienten aus Proben, die am gleichen Tag gewonnen wurden. Drei der verbleibenden 13 Bedside-Proben wurden 1 Tag vor der PCR-Probe gewonnen und richtig-positiv getestet. Bei 10 Patienten wurden die gewerteten Bedside-Proben 1 bis 4 Tage ( $m=1$  Tag) nach der jeweils gewerteten PCR-Probe gewonnen und richtig-positiv ( $n=5$ ), richtig-negativ ( $n=3$ ) und falsch-negativ (Pat. 23) bzw. falsch-positiv (Pat. 22) eingeschätzt.

Bei 16 (25 %) der 65 Patienten stimmten die gewerteten Befunde von Bedside-Testung und Referenz-PCR nicht überein. Dabei zeigte 1 Patient eine falsch-positive Bedside-Testung (Pat. 22). Dieser Patient wies zeitgleich mit weiteren Patienten der Station Diarrhoen, Fieber und Übelkeit auf (Severity Score: 6). Die Proben für Bedside-Testung und PCR wurden am Tag des Symptombeginns aus 2 verschiedenen Stühlen gewonnen. Bei Eintreffen des PCR-Befundes war

der Patient bereits zu Hause, so dass keine erneute Testung auf NV und weitere Darmpathogene erfolgen konnte. Die Nachttestungen mit RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG II (Ct=32,71), RIDA<sup>®</sup>QUICK NV und RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV (E=0,651) zeigten bei diesem Patienten positive Resultate.

Insgesamt wurden 15 der 65 Patienten mittels RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung falsch-negativ eingeschätzt, wobei 3 dieser 15 Patienten im RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG I-positiv waren (siehe Proben-bezogene Auswertung). Die verbleibenden 12 falsch-negativ eingeschätzten Patienten waren mittels Referenz-PCR GG II NV-positiv. Tabelle 14 zeigt eine Übersicht der klinischen Symptomatik in den Gruppen der richtig-positiv und falsch-negativ eingeschätzten Patienten.

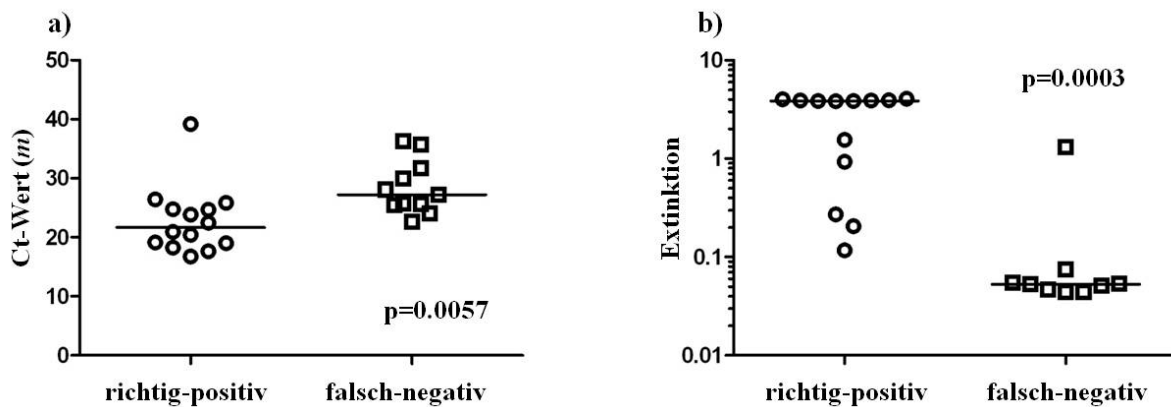
**Tabelle 14: Gegenüberstellung der mittels RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung richtig-positiv und falsch-negativ eingeschätzten Patienten**

		richtig-positiv (n=17)	falsch-negativ (n=15)	p (Mann-Whitney-U)
<b>Schweregrad</b> Severity Score <sup>35</sup> [ <i>m</i> ( <i>R</i> )]		10 (4-13)	9 (3-16)	0,06
<b>Klinik</b> [n (%)]	Erbrechen + Diarrhoe	13 (77)	8 (53)	
	nur Diarrhoe	3 (18)	7 (47)	
	nur Erbrechen	1 (6)	0 (0)	
<b>Tage zwischen Symptombeginn und Bedside-Testung</b>	[ <i>m</i> ( <i>R</i> )]	1 (0-5)	1 (0-4)	0,45
<b>Ct-Wert*</b>	[ <i>m</i> ( <i>R</i> )]	21,70 (16,78-39,19) <sup>a</sup>	27,23 (22,63-36,29) <sup>b</sup>	0,0057
<b>Extinktion*</b>	[ <i>m</i> ( <i>R</i> )]	3,858 (0,117-4,016) <sup>c</sup>	0,053 (0,044-1,307) <sup>d</sup>	0,0003

\* nur Proben, welche am gleichen Tag ( $\pm 24$  Stunden) wie die Proben der gewerteten Bedside-Testung gewonnen wurden sind berücksichtigt <sup>a</sup>(n=14), <sup>b</sup>(n=11), <sup>c</sup>(n=13), <sup>d</sup>(n=9)

Der Medianwertvergleich des Severity Scores in diesen Patientengruppen zeigte höhere Werte der richtig-positiv ( $m=10$ ) gegenüber den falsch-negativ ( $m=9$ ) getesteten Patienten. Dieser Unterschied war nicht signifikant ( $p=0,06$ ). Der Medianwertvergleich der Tage zwischen Symptombeginn und Probengewinnung für die Bedside-Testung zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,45$ ). Der Median des Ct-Wertes in der Gruppe der falsch-negativ getesteten Patienten war hingegen mit 27,23 signifikant höher ( $p=0,0057$ ) gegenüber der richtig-positiv eingeschätzten Patientengruppe mit 21,70. Der Medianwertvergleich der Extinktion

zeigte in der Gruppe der richtig-positiv eingeschätzten Patienten einen signifikant höheren Wert ( $p=0,0003$ ) gegenüber der Gruppe der falsch-negativen Patienten. (Tabelle 14, Abbildung 11)

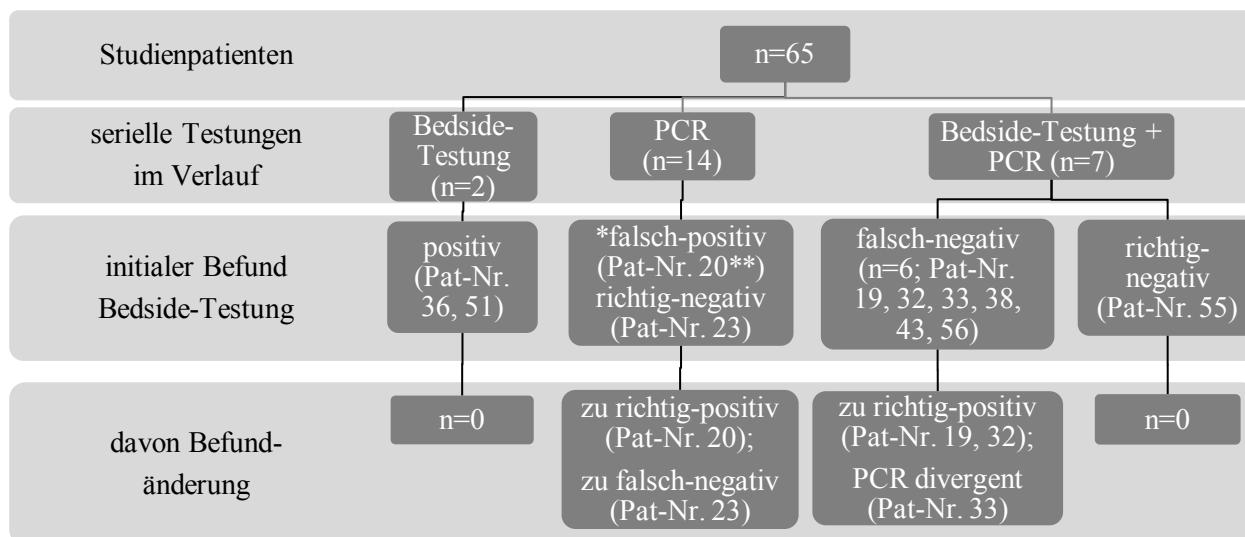


**Abbildung 11: Medianwertvergleich der Ct-Werte (a) und Extinktionen (b) von richtig-positiv und falsch-negativ getesteten Patienten**

Bei Patienten mit diskrepanten Befunden von Bedside-Testung und Referenz-PCR wurden die erhobenen Daten nach Auffälligkeiten gesichtet. Einer der 15 falsch-negativ eingeschätzten Patienten zeigte eine positive Reise- und Umfeldanamnese (Pat. 43). Dieser Patient stellte sich 6 Tage nach Rückkehr von einer 2-wöchigen Vietnam- und Kambodscha-Reise mit typischer Symptomatik (Severity Score: 10) in der Rettungsstelle vor. Die Ehefrau gab bis zum Vortag ähnliche Symptome bei ambulant positivem NV-Nachweis an. Bei Aufnahme wurden Proben aus demselben Stuhl gewonnen, die RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung war negativ bei positiver PCR auf GG II NV (Ct=25,67). Beide Verfahren wurden an Stuhlproben vom Folgetag mit erneut falsch-negativem Befund (Ct=19,69) wiederholt. Nachtstungen mit RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG II waren in beiden Proben positiv (Ct= 29,84; 29,32), während RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Nachtstung und RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV an Tag 1 negativ (E=0,051) und Tag 2 positiv (E=3,985) ausfielen. Das Vorliegen enteropathogener Bakterien wurde ausgeschlossen.

Insgesamt wurden Proben von 13 der 15 falsch-negativ eingeschätzten Patienten auf weitere Darmpathogene untersucht [Clostridium difficile Toxin A/B (n=7), enteropathogene Bakterien (n=7), Rotaviren (n=1)], wobei bei einem der 13 Patienten Clostridium difficile Toxin A/B 4 Tage nach Symptombeginn nachgewiesen wurde. Dieser Patient (Pat. 60) zeigte 1 Tag nach Verlegung aus einer anderen Klinik, wo Mitpatienten NV-positiv gewesen seien, Diarrhoen und Fieber (Severity Score: 4). Die Bedside Testung war negativ bei positiver Referenz-PCR auf GG II NV (Ct=36,29) an Proben aus demselben Stuhl. Die Nachtstungen waren mit allen drei Verfahren negativ.

Insgesamt wurden von 23 (35 %) der 65 Studienpatienten mehrere Proben ( $R=2-4$ ;  $m=2$ ) im Verlauf untersucht. Davon erfolgten Verlaufsuntersuchungen bei 2 Patienten lediglich mit RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung (Pat. 36, 52), bei 13 Patienten mit PCR (sowie Labor-Nachtestungen der R-Biopharm AG in Darmstadt) und bei 7 der 23 Patienten mit RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung sowie PCR (und Labor-Nachtestungen). Befundänderungen zeigten sich im Verlauf bei 5 (22 %) dieser 23 Patienten (Pat. 19, 20, 23, 32, 33). (Abbildung 12)



**Abbildung 12: Verlaufsuntersuchungen bei 23 der 65 Studienpatienten und Änderungen des Befundes von RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung oder Referenz-PCR** (\*lediglich Angabe bei Patienten mit Befundänderung, \*\*bezogen auf Stuhlprobe)

Bei einer dieser 5 Patienten (Pat. 23) trat parallel zu Mitpatienten Diarrhoen auf (Severity Score: 8). Stuhlproben wurden an Tag 0, 3, 5 und 8 nach Symptombeginn gewonnen. An Tag 0 waren die Befunde der GG II NV-PCR und der 3 Nachtestungen konsistent negativ. Bei weiter anhaltender Symptomatik erfolgte an Tag 3 der Studieneinschluss, die Stuhlproben waren in RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung und Referenz-PCR negativ, in der Nachtestung mit allen 3 Verfahren positiv (GG II Ct=28,38; E=1,558). Verlaufsstuhlproben von Tag 5 waren in der GG II NV-PCR im Institut für Virologie der Charité positiv (Ct=22,34), im RIDA<sup>®</sup>GENE GG I & II negativ und von Tag 8 bei nun asymptomatischer Patientin mit GG II NV-PCR (Ct=18,95), RIDA<sup>®</sup>GENE GG II (Ct=28,92), RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Nachtestung und RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV (E=3,747) positiv. Die Patientin wurde auf Grund der Definitionen für die patientenbezogene Auswertung insgesamt falsch-negativ eingeschätzt.

Stuhlproben von einem weiteren der 5 Patienten (Pat.: 32) wurden mit Symptombeginn (Severity Score: 12) gewonnen, die RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung war zunächst falsch-negativ

gegenüber der Referenz-PCR auf GG II NV (Ct=22,92). Bei Wiederholung an weiteren Stuhlproben nach 2 Tagen zeigten sich Bedside-Testung und PCR positiv (Ct=17,24), so dass der Patient richtig-positiv eingeschätzt wurde. Nachtstungen beider Proben mit RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG II (Ct 33,82; 20,93), RIDA<sup>®</sup>QUICK und RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV (E 1,023; 4,095) waren konsistent positiv. Stuhlproben von 3 weiteren Patienten mit seriellen Bedside-Testungen und zu Symptombeginn falsch-negativem Befund wurden nach 1 (n=2) bzw. 2 (n=1) Tagen erneut falsch-negativ getestet (Pat. 38, 43, 56). Zu beobachten waren dabei höhere Ct-Werte der initialen Proben (Ct GG II PCR: 27,23; 25,67; 31,69; Ct RIDA<sup>®</sup>GENE: 34,79; 29,84; 34,27) im Vergleich zu den Proben nach 1 (Ct GG II PCR: 25,68; 19,69; Ct RIDA<sup>®</sup>GENE: 33,66; 29,29) bzw. 2 Tagen (Ct GG II PCR=29,77; RIDA<sup>®</sup>GENE negativ). Nachtstungen mit RIDA<sup>®</sup>QUICK und RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV waren bis auf 1 IC einer initialen Probe (Pat. 38) sowie 1 IC und ELISA einer Verlaufsprobe (Pat. 43) negativ.

Eine weitere Patientin (Pat. 33) stellte sich 1 Tag nach Einsetzen ausgeprägter Symptome (Severity Score: 16) in der Rettungsstelle vor. Bei Aufnahme gewonnene Stuhlproben waren in der Bedside-Testung falsch-negativ für GG II NV (Ct=28,09). Stuhlproben, die am Folgetag gewonnen wurden, zeigten in der Bedside-Testung und GG II NV-PCR negative Resultate. Nachtstungen der initialen Probe waren mit RIDA<sup>®</sup>QUICK NV und RIDA<sup>®</sup>GENE GG II positiv (Ct=31,77), mit RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV negativ und die Nachtstungen der Verlaufsprobe waren mit allen 3 Methoden negativ.

Zwei richtig-positiv eingeschätzte Patienten zeigten Befundänderungen. Bei einem Patienten (Pat. 20) wurden 1 Tag nach Symptombeginn (Severity Score: 10) im Rahmen gehäufte NV-Verdachtsfälle auf der Station Proben von Stuhl und Erbrochenem gewonnen. Beide waren in der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung positiv, während die GG II NV-PCR im Stuhl negativ und im Erbrochenen positiv (Ct=16,78) war. An Tag 2 und 13 Tage nach Symptombeginn wurden weitere Stuhlproben für die PCR gewonnen und mit GG II NV-PCR an Tag 2 negativ, an Tag 13 positiv (Ct=37,67) getestet. Nachtstungen mit RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG I & II, RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Nachtstung und RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV waren konsistent negativ bei allen 3 Stuhlproben, im Erbrochenen hingegen positiv (Ct= 25,16; E=3,863).

Bei Pat. 19 wurde mit Einsetzen von Übelkeit und Erbrechen (Severity Score 4) Erbrochenes gewonnen und mittels Bedside-Testung falsch-negativ für GG II NV (Ct=27,30) eingeschätzt. Nach 2 Tagen zeigten Stuhlproben der nun asymptomatischen Patientin eine richtig-positive Bedside-Testung (Ct GGII=33,50). Nachtstungen des Erbrochenen (Ct=29,93) und der Stuhlprobe (Ct=26,62) mit RIDA<sup>®</sup>GENE GG II und RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Nachtstung waren positiv. RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV war im Erbrochenen negativ, im Stuhl positiv (E=3,832).

#### 4.5 Bestimmung der Testzuverlässigkeit in Ausbruchssituationen

Die theoretische Zuverlässigkeit der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung in der Diagnostik NV-bedingter GE-Ausbrüche wurde anhand der Studiendaten berechnet. Um Verfälschungen durch die Auswahl der gewerteten Befunde der Patienten-bezogenen Auswertung (Variante A) auszuschließen, wurden der Referenz-PCR vergleichend die Ergebnisse der Bedside-Testung gegenübergestellt, wenn jeweils nur die initial untersuchte Stuhlprobe (Variante B) gewertet wurde (Tabelle 15). Die Sensitivität betrug 53 % (17/32) bei Variante A und 50 % (16/32) bei Variante B, die Spezifität beider Varianten lag bei 97 % (32/33). Die Prävalenz NV-positiver Befunde in der Studienpopulation betrug 49 % (32/65). Die Erkrankungsfälle dieser Studie standen nur vereinzelt in einem epidemiologischen Zusammenhang.

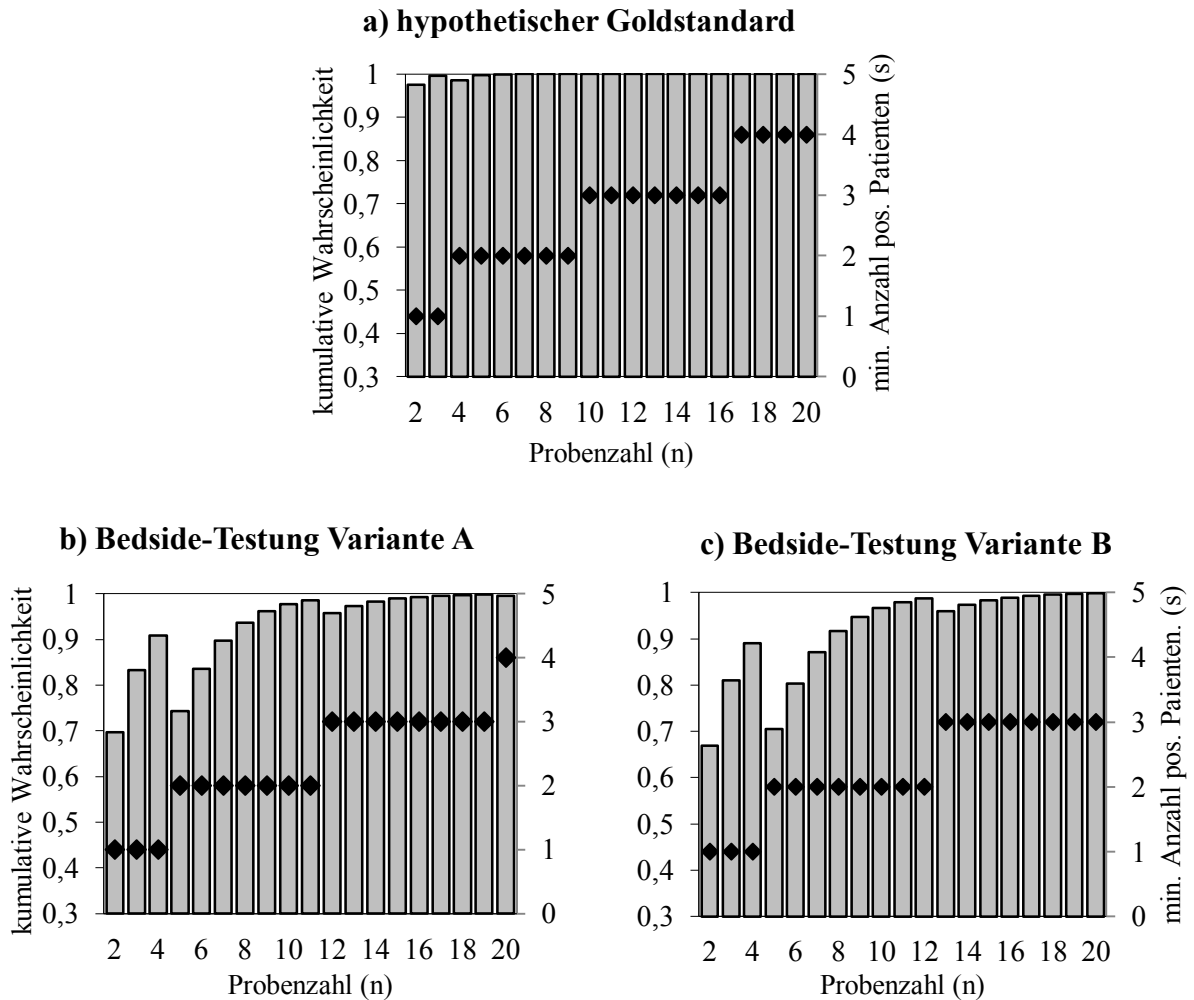
**Tabelle 15: Ergebnisse (n) der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung und Referenz-PCR bei den 65 Studienpatienten gewertet entsprechend den Varianten A und B**

		Bedside-Testung A (n)		Bedside-Testung B (n)	
		positiv	negativ	positiv	negativ
Referenz-PCR (n)	positiv	17	15	16	16
	negativ	1	32	1	32

Die schwarzen Rauten in Abbildung 13 a-c zeigen die jeweilige Mindestzahl positiv zu testender Patientenproben bezogen auf einen hypothetischen Goldstandard bzw. die RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung (Variante A bzw. B), um einen Ausbruch akuter GE mit einer Sicherheit von >95 % als NV-bedingt (die Prävalenz positiver Befunde in einer definierten Probenzahl liegt somit  $\geq 8$  %) zu identifizieren. Die Mindestzahl an positiv zu testenden Proben steigt mit der Anzahl der zur Verfügung stehenden Proben. Dabei ist bei Testung von 2 bis 4 Proben mittels RIDA<sup>®</sup>QUICK NV (Varianten A/B) ein positiver Befund ausreichend. Bei Testung von 5 bis 11 (A) bzw. 5 bis 12 (B) Proben sind 2, bei 12 bis 19 (A) bzw. 13 bis 20 (B) Proben 3 und bei 20 Proben 4 (A) positive Befunde notwendig. Bei Anwendung des hypothetischen Goldstandards steigt die minimale Anzahl bereits ab Testung von 4 Proben auf 2, ab 10 Proben auf 3 und ab 17 Proben auf 4 positive Befunde.

Die grauen Balken in Abbildung 13 a-c zeigen die kumulativen Wahrscheinlichkeiten, jeweils die notwendige Mindestzahl positiver Patientenproben im verfügbaren Probenumfang zu detektieren. Diese Wahrscheinlichkeiten steigen mit dem verfügbaren Probenumfang.





**Abbildung 13: Minimale Anzahl positiver Befunde eines GE-Ausbruchs, um diesen mit >95 %-iger Wahrscheinlichkeit als NV-bedingt (Prävalenz positiver Befunde  $\geq 8$  %) zu identifizieren (◆) und die kumulativen Wahrscheinlichkeiten (□), diese in einer entsprechenden Stichprobe zu detektieren mit (a) einem hypothetischen Goldstandard ( $se=1$ ;  $sp=1$ ) und der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung (b) Variante A ( $se=0,53$ ;  $sp=0,97$ ) oder (c) B ( $se=0,5$ ;  $sp=0,97$ )**

Bei den Berechnungen für die Bedside-Testung zeigt sich jeweils ein sprunghafter Abfall der kumulativen Wahrscheinlichkeit wenn die minimale Anzahl positiver Befunde von 1 auf 2 und weniger ausgeprägt von 2 auf 3 steigt. Bei gleichem Probenumfang sind die kumulativen Wahrscheinlichkeiten des Goldstandards erwartungsgemäß konsistent höher verglichen mit der Bedside-Testung (Varianten A/B). Beim hypothetischen Goldstandard liegt die kumulative Wahrscheinlichkeit bei Testung von  $\geq 5$  Proben durchweg über 99 %. Ein Wert von 99 % wird beim RIDA<sup>®</sup>QUICK NV erst bei Testung von 16 (Variante A) bzw. 17 Proben (Variante B)

erreicht. Die kumulativen Wahrscheinlichkeiten der weniger sensitiven Variante B sind, mit Ausnahme der Daten für eine Probengesamtzahl von 12 bzw. 20 (wobei für A jeweils ein positiver Befund mehr erforderlich ist) durchweg geringer als die korrespondierenden Wahrscheinlichkeiten von Variante A. Für die korrekte Identifikation eines NV-bedingten Ausbruchs mit einer kumulativen Wahrscheinlichkeit  $>90\%$  müssen mittels Bedside-Testung Variante A 4 bzw.  $\geq 8$  Proben und bei Variante B mindestens 8 Proben verschiedener Patienten untersucht werden.

### 5. Diskussion

Beim RIDA<sup>®</sup>QUICK NV (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) handelt es sich um einen immunchromatografischen Schnelltest (IC), der innerhalb von 20 Minuten den Nachweis von Genogruppe (GG) I und II Noroviren (NV) in humanen Stuhlproben ermöglicht. Bisherige Evaluierungen des Tests basieren auf Untersuchungen unter standardisierten Laborbedingungen an überwiegend gefrorenen Stuhlproben.<sup>69,70,76-80</sup> Ziel der Studie war die Anwendbarkeit und diagnostische Zuverlässigkeit des RIDA<sup>®</sup>QUICK NV als Bedside-Test unter realistischen Bedingungen im Klinikalltag mit dem derzeitigen „Goldstandard“, der real-time PCR, zu vergleichen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden zwischen Oktober 2010 und Juli 2011 insgesamt 76 frische Proben von 65 Patienten mit akuter Gastroenteritis (GE) am Campus Benjamin Franklin mit dem RIDA<sup>®</sup>QUICK NV getestet. Dabei erfolgten 68 (89 %) der 76 Bedside-Testungen durch dieselbe Person. Die Durchführung war meist unkompliziert, jedoch wurden Probleme bei der Handhabung nicht systematisch erfasst. Schwierig gestaltete sich das Abmessen und Homogenisieren mittels Einwegpipette bei 6 festen Stuhlproben. Interessanterweise zeigten 3 dieser 6 Proben falsch-negative Testergebnisse. Zudem war bei 8 der 76 Bedside-Testungen die Testbande so schwach verfärbt bzw. traten Verfärbungen außerhalb der zu erwartenden Banden auf, so dass die Befundinterpretation unsicher war. Die entsprechenden Testungen wurden umgehend wiederholt, wobei sich die erste Einschätzung bei 7 dieser Proben bestätigte. Die Bedside-Testung der verbleibenden Stuhlprobe zeigte wiederholt Artefakte bei zunächst positivem, dann negativem Befund.

Insgesamt stimmten die gewerteten Befunde von RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung und Referenz-PCR bei 49 der 65 (75 %) Studienpatienten überein. Dabei wurde nur ein Patient (Pat. 22) in der Bedside-Testung falsch-positiv eingeschätzt und die Spezifität war mit 97 % hoch. Dies deckt sich mit den Herstellerangaben zur Spezifität (95 %) sowie Ergebnissen aus bisherigen Evaluierungstudien (98 bis 100 %), wobei jeweils  $\geq 62$  Stuhlproben untersucht wurden.<sup>69,70,76-80</sup> Falsch-positive Befunde können auf RNasen oder Denaturierung der RNA in der Probe beruhen. Es sind jedoch auch unspezifische Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper des ICs mit Inhaltsstoffen der Probe denkbar.<sup>76,85</sup> Bei der Testentwicklung wurden Interferenzen des RIDA<sup>®</sup>QUICK NV, beispielsweise mit Rotaviren oder Muzinen, ausgeschlossen, die tatsächlichen Zusammensetzungen der klinischen Proben sowie deren

Auswirkungen auf das Testergebnis sind unbekannt.<sup>76–78,80</sup> Insgesamt spiegelt jedoch ein positiver RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Test mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine NV-Infektion wider.

Die Sensitivität der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung war mit 53 % begrenzt. Deutlich höher ist die vom Hersteller angegebene Sensitivität von 86 %, die durch Labor-Testung von 113 gefrorenen Stuhlproben ermittelt wurde.<sup>78</sup> Weitere Evaluierungsstudien, die ausnahmslos unter Laborbedingungen an 62 bis 728 überwiegend gefrorenen Stuhlproben erfolgten, zeigten mit 52 bis 83 % ebenfalls geringere Werte für die Sensitivität.<sup>69,70,76,77,79,80</sup> Auch die Literaturangaben zur Sensitivität weiterer NV-spezifischer Antigen tests schwanken zwischen 35 und 90 % für ICs und <30 bis >70 % für ELISAs.<sup>72,74,76,77</sup> Somit konnte in der vorliegenden Studie eine Sensitivität für den RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Test unter Alltagsbedingungen ermittelt werden, welche in einem Bereich liegt, die für diesen und andere Antigen tests unter standardisierten Laborbedingungen ermittelt wurde und in Publikationen angegeben ist.

Ein weiteres Ziel der Studie war die Identifizierung möglicher Einflussfaktoren auf falsch-positive und falsch-negative Bedside-Testungen. Der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV wurde in bisherigen Evaluierungen stets einer PCR als Referenzmethode gegenüber gestellt, die Protokolle zum Nachweis von GG II in einer oder I und II NV in 5 weiteren Arbeiten waren jedoch verschieden.<sup>69,70,76,77,79,80</sup> Während die PCR virale RNA detektiert, basieren Enzymimmunoassays auf dem Nachweis von NV-Antigenen (Kapsidproteinen). Die Konzentrationen von RNA und Antigen in einer Probe sind nicht identisch, da sie unterschiedliche Stabilität und Aggregationsneigung aufweisen.<sup>48</sup> Die Verfahren sind somit vielmehr ergänzend als alternativ anzusehen.<sup>65,66</sup> Die real-time PCR hat sich als „Goldstandard“ durchgesetzt, absolute diagnostische Sicherheit bietet aber auch sie nicht. So zeigte eine europäische, multizentrische Vergleichsstudie, in der verschiedene PCR-Protokolle zum Einsatz kamen, dass NV nur bei maximal 84 % der 85 analysierten Proben mit zumindest einem PCR-Protokoll detektiert wurden.<sup>71</sup> Auch in der vorliegenden Studie stimmten die Befunde von GG II NV-PCR im Institut für Virologie der Charité und RIDA<sup>®</sup>GENE GG II lediglich bei 79 (88 %) der 90 GG II-positiven Proben überein. Als mögliche Ursachen von Befunddiskrepanzen bei der PCR-Diagnostik sind das Vorkommen von Inhibitoren in der Probe, Probenalteration durch Transport und Lagerung, Kontaminationen, die Verwendung unterschiedlicher Verfahren zur RNA-Extraktion sowie die unterschiedlichen Primersequenzen zu diskutieren.<sup>25,71</sup>

Sequenzanalysen verschiedenster Proben zeigten, dass das Spektrum zirkulierender NV je nach Zeit, geografischer Region, hospitalisiertem und ambulantem Setting sowie sporadischen und ausbruchassoziierten Fällen variiert.<sup>32,74,79</sup> Bisherige Evaluierungen des RIDA<sup>®</sup>QUICK NV unterscheiden sich hinsichtlich Ort und Zeit der Probensammlung und somit des untersuchten NV-Spektrums.<sup>69,70,76,77,79,80</sup> Dabei wird die Testzuverlässigkeit aller Nachweismethoden durch die ausgeprägte genetische Variabilität und Antigenvielfalt zirkulierender NV-Genotypen beeinflusst.<sup>25,74</sup> RIDA<sup>®</sup>QUICK NV und RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV basieren auf 7 monoklonalen Antikörpern gegen Antigene verschiedener GG I und II NV. Auffällig waren die konsistent falsch-negativen Befunde des RIDA<sup>®</sup>QUICK NV bei 3 GG I-positiven Proben von 3 Patienten sowohl in der Bedside- als auch Nachtestung. Diese Beobachtung deckt sich mit Publikationen zum RIDA<sup>®</sup>QUICK NV, in der eine Sensitivität von nur 0 bis 42 % beim Nachweis von GG I NV (n=6-58) angegeben ist.<sup>69,76,77,80</sup> Eine vergleichende Studie mit 4 NV-spezifischen ICs zeigte, dass alle 4 untersuchten Tests Sensitivitäten von nur 17 bis 52 % gegenüber GG I (n=48-81 Proben) aufwiesen bei Sensitivitäten von 39 bis 64 % für GG II NV (n=87-160 Proben).<sup>77</sup> Dabei zeigte der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV für GG I die geringste (17 %), jedoch für GG II die höchste (64 %) Sensitivität.<sup>77</sup> Beim immunologischen Antigen-Nachweis ist die Auswahl der Antikörper entscheidend, die möglichst mit einer Vielzahl verschiedener Virusvarianten interagieren sollten.<sup>25</sup> Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen sind jedoch hochspezifisch. Für Genotyp II.3 NV wurde gezeigt, dass bereits ein einziger Basenaustausch eine Störung der Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen bewirken kann und Kreuzreaktivitäten zwischen verschiedenen NV-Varianten bei Antigen-ELISAs nur auftraten wenn die Sequenzen der RNA-Polymerase zu >95 % übereinstimmten.<sup>16</sup> Bei einem Genotyp II.3 und II.4 NV-spezifischen IC wurden Kreuzreaktivitäten mit einigen, nicht aber allen untersuchten Genotypen beobachtet.<sup>72</sup> Kreuzreaktivitäten mit möglichst vielen Genotypen reduzieren jedoch das Auftreten falsch-negativer Testungen, sind also erwünscht.<sup>66,74</sup>

Interessanterweise war die Bedside-Testung von Stuhlproben eines Patienten (Pat. 43) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen negativ, während die jeweilige PCR positiv für GG II NV ausfiel. Der Patient erkrankte 2 Wochen nach einer Rundreise durch Vietnam und Kambodscha. Auch die Ehefrau habe bis zum Vortag ähnliche Symptome bei ambulant positiver NV-PCR gezeigt. Möglicherweise handelte es sich um eine in Deutschland seltene Virusvariante, deren Antigenstruktur nicht mittels RIDA<sup>®</sup>QUICK NV erfasst wird, jedoch eine mittels PCR nachweisbare NV-spezifische Sequenz aufweist.<sup>74</sup> Allerdings erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine entsprechende Subtypisierung dieser beiden Stuhlproben, so dass die mögliche Ursache für die Befunddiskrepanz nicht belegt werden kann. Insgesamt detektiert der

RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Erkrankungen mit dem vorherrschenden Genotyp II.4 mit einer Sensitivität von 78 bis 88 % ausreichend zuverlässig.<sup>69,76,77</sup> Problematisch sind hingegen nicht-reaktive Genotypen und Mutanten mit veränderter Antigen-Präsentation.<sup>65,66,69,72,79</sup> Zur Vermeidung falsch-negativer Testungen ist die stete Weiterentwicklung und Anpassung der Nachweisverfahren, insbesondere der Antigentests, an das aktuelle NV-Spektrum nötig.<sup>25,73,79</sup> Die Produktion NV-spezifischer Antikörper und deren Integration in Enzymimmunoassays ist jedoch verglichen mit der Anpassung von PCR-Primern deutlich zeit- und kostenintensiver.

Die Spezifität der Wechselwirkungen zwischen Testantikörpern und einzelnen NV-Antigenen kann beträchtlich schwanken und es resultieren unterschiedliche Nachweisgrenzen verschiedener Genotypen.<sup>16</sup> So detektierten alternative NV-spezifische ICs Genotyp II.3 ab Konzentrationen von  $3,5 \times 10^7$  bis  $10^8$  und II.4 ab  $4,6 \times 10^6$  bis  $10^7$  Partikeln pro g Stuhl.<sup>72,73,81</sup> Entsprechende Beobachtungen bei ELISAs sind vergleichbar.<sup>86,87</sup> Folglich ist die Virusmenge in der Probe für die Sensitivität der Nachweisverfahren entscheidend.<sup>20</sup> Dabei sind Schwankungen der Viruslasten bei Infektionen mit unterschiedlichen NV-Genotypen beschrieben. So ist die mittlere Viruskonzentration von GG I NV bis zu 100-fach geringer als bei GG II, mit den höchsten Werten für Genotyp II.4.<sup>32,52</sup> Dies könnte, neben einer unzureichenden Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, die falsch-negativen IC-Testungen der 3 GG I-positiven Proben zumindest teilweise erklären.

Semiquantitative Aussagen über die Menge an RNA und Antigenen in der Probe lassen sich anhand des Ct-Wertes bei der real-time PCR bzw. der Extinktion (E) beim ELISA treffen.<sup>47,88</sup> Die Mediane von Ct-Wert und E der mittels RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung richtig-positiv und falsch-negativ für GG II NV eingeschätzten Patientengruppen wurden verglichen. Dabei zeigten die Proben falsch-negativ getesteter Patienten signifikant höhere Ct-Werte ( $p=0,0057$ ) und niedrigere E ( $p=0,0003$ ) gegenüber den richtig-positiv getesteten Patienten, was auf geringere RNA- und Antigenmengen in falsch-negativen Proben hindeutet. Dies deckt sich mit den entsprechenden Medianwertvergleichen von Ct-Wert ( $p<0,0073$ ) und E ( $p<0,0001$ ) am gesamten Probenumfang für die RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung und Nachttestung. Ebenso wurden bei einer publizierten Evaluierungsstudie zum RIDA<sup>®</sup>QUICK NV höhere Ct-Werte bei falsch-negativ im Vergleich zu richtig-positiv getesteten Stuhlproben beobachtet.<sup>80</sup> Geringe Viruslasten begünstigen folglich das Auftreten falsch-negativer Enzymimmunoassays. Bei 4 der 24 (17 %) mittels RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Nachttestung richtig-positiv getesteten Proben fiel eine nur schwache Bandenfärbung auf. Bei diesen 4 Proben wurden höhere Ct-Werte und

niedrigere Extinktionen gegenüber den 20 Proben mit deutlicher Bandenfärbung beobachtet. Dies spricht für einen Zusammenhang zwischen geringer Viruslast und schwacher Bandenfärbung. Hingegen wurden 11 der 16 (69 %) richtig-positiven RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testungen subjektiv als nur schwach gefärbt eingeschätzt, wobei hier kein Zusammenhang mit Ct-Wert und E auffiel. Zur Objektivierung des Einflusses der Versuchsbedingungen auf das Testergebnis wurden die insgesamt 93 gefrorenen Rückstellproben im Partnerlabor der R-Biopharm AG in Darmstadt unter standardisierten Laborbedingungen nachuntersucht. So betrug die Sensitivität bei der Proben-bezogenen Auswertung der insgesamt 73 Bedside-Testungen lediglich 44 %, und bei der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Nachtestung an 88 verdünnten, zwischenzeitlich gefrorenen Rückstellproben 56 %, erreichte allerdings nicht die vom Hersteller angegebene Sensitivität von 86 %. Interessanterweise war auch die Sensitivität des RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV mit 61 % geringer als die Herstellerangaben (jeweils 93 und 79 % in verschiedenen untersuchten Probengruppen).<sup>83</sup>

Möglicherweise erklärt sich die geringere Sensitivität der Bedside-Testung durch die Untersuchung frischer Proben unter nicht-standardisierten Bedingungen. So neigen NV zur Aggregation, die Viruspartikel sind also ungleich in einer Probe verteilt.<sup>27,52</sup> Ziel der Homogenisierung ist es, die Partikel gleichmäßig zu verteilen. Eine Homogenisierung dürfte unter Laborbedingungen bei Verwendung eines Vortexers, insbesondere bei festen Stuhlproben, deutlich effektiver sein als mit einer Einwegpipette bei der Bedside-Testung. Dies könnte falsch-negative Bedside-Testungen, wie sie bei 3 der 6 (50 %) festen Stuhlproben auftraten, zumindest teilweise erklären.

Eine publizierte Evaluierungsstudie zum RIDA<sup>®</sup>QUICK NV zeigte einen Anstieg der Sensitivität von 74 auf 83 %, wenn die Proben (n=100) zwischen Eintreffen im Labor und Testung bei -20 °C eingefroren statt bei 4 °C gelagert wurden.<sup>76</sup> In einer weiteren Studie wurde ein Anstieg der Sensitivität von 71 auf 78 % beim Vergleich von 74 frischen mit 218 eingefrorenen Stuhlproben beobachtet.<sup>77</sup> Entsprechendes wurde für einen weiteren NV-spezifischen IC sowie Rotavirus-spezifische ELISAs gezeigt.<sup>73,89</sup> Möglicherweise trägt das Auftauen und mehrfache Zentrifugieren zu einer besseren Probendurchmischung und homogeneren Verteilung der Viruspartikel in der Probe bei.<sup>90</sup> Zudem können im Rahmen der Prozessierung, beispielsweise durch Verlagerung zunächst innen gelegener Epitope an die Oberfläche, Antigene demaskiert werden.<sup>73</sup> Bei einem Studienpatienten (Pat. 32) zeigte sich initial ein falsch-negativer Befund in der Bedside-Testung und die Antigen-Nachtestungen unter Laborbedingungen waren richtig-positiv. Möglicherweise wurde die Probe dieses Patienten bei

der Bedside-Testung ungenügend durchmischt oder die Antigen-Präsentation durch Prozedur verändert.

Insgesamt scheint sich die Präanalytik der Bedside-Proben stärker auf das Testergebnis auszuwirken als die Vorverdünnung der Rückstellproben mit physiologischer Kochsalzlösung. Verdünnungen verringern einerseits die Viruskonzentration, so dass diese bis unter die Nachweisgrenze sinken kann. So war der Median der korrespondierenden Ct-Werte der NV-positiven frischen Proben der GG II NV-PCR im Institut für Virologie der Charité deutlich geringer ( $m=24,395$ ) verglichen mit dem RIDA<sup>®</sup>GENE NV GG II an Rückstellproben ( $m=30,64$ ). Abgesehen von den methodischen Unterschieden lässt dies niedrigere Viruskonzentrationen in den Rückstellproben vermuten, jedoch war die Spannweite der Ct-Werte von Proben mit divergenten PCR-Befunden auffallend groß ( $R=22,34-37,67$ ). Zudem beeinflussen verschiedene Pufferlösungen in unterschiedlichem Maße die Aggregationsneigung der Viruspartikel.<sup>27</sup> Bei der genannten Vergleichsstudie verschiedener PCR-Protokolle konnten 64 % der falsch-negativen Resultate auf 1:10 mit Salzlösung verdünnte Stuhlproben zurückgeführt werden.<sup>71</sup> Für den RIDA<sup>®</sup>QUICK NV zeigte eine Evaluierungsstudie ein Sinken der Sensitivität von 74 auf 67 %, wenn statt des mitgelieferten Probenverdünnungspuffers eine andere Pufferlösung zur Herstellung der 100 Stuhlsuspension verwendet wurde.<sup>76</sup>

Folglich sollte auch im Klinikalltag auf möglichst optimale Testbedingungen geachtet werden. Während das Einfrieren von Proben vor der Testung nicht mit der Anwendung als Bedside-Test vereinbar ist, erscheint die Verwendung eines Vortexers zur Probenhomogenisierung durchaus sinnvoll. Zur besseren Handhabbarkeit sollten nicht mehr als 2 oder 3 Proben parallel analysiert werden. Im Jahr 2012 brachte der Hersteller eine neue vereinfachte Version des ICs mit weniger Reaktionsschritten auf den Markt.<sup>91</sup> Das Konzept erscheint vielversprechend, eine Erprobung im Klinikalltag erfolgte bislang nicht.

Bisherige Daten zum RIDA<sup>®</sup>QUICK NV basieren ausschließlich auf der Analyse von Stuhlproben.<sup>69,70,76-80</sup> Die Pathophysiologie und Virusreplikation findet jedoch im oberen Dünndarm statt und klinisches Leitsymptom der NV-GE ist plötzliches, schwallartiges Erbrechen, wobei jeweils bis zu 30 Millionen Viruspartikel freigesetzt werden können.<sup>6,11,26,62</sup> Erbrochenes ist in der Praxis oft schneller verfügbar. Im Rahmen der Studie wurden 3 entsprechende Proben untersucht und zeigten in der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung richtig-positiv ( $n=1$ ) bzw. falsch-negativ ( $n=2$ ) Ergebnisse. Die RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Nachtestungen fielen richtig-positiv ( $n=2$ ) bzw. falsch-negativ ( $n=1$ ) aus. Der Ct-Wert der richtig-positiven Probe war deutlich geringer (16,78) als die Ct-Werte der falsch-negativen Proben mit positiver



(27,30) bzw. negativer (36,73) Nachtestung. Ähnlich verhält es sich mit den 2 untersuchten Ileostoma-Proben, welche in der Bedside-Testung richtig-negativ und bei hohem Ct-Wert (35,47) falsch-negativ getestet wurden. Folglich könnten falsch-negative Testungen einerseits durch geringe Viruslasten erklärt werden. Andererseits unterscheidet sich Erbrochenes vor Allem im pH-Wert und Dünndarmstuhl im Gehalt an Wasser und Pankreasenzymen von üblichen Stuhlproben. In der Literatur finden sich bislang weder Untersuchungen zu jeweiligen Viruskonzentrationen noch zum Einfluss von pH-Wert und Pankreasenzymen auf die Testreaktivität. Basierend auf den sehr geringen Probenzahlen erscheint der Nachweis von NV-Antigen zumindest möglich.

PCR-Studien zeigten an 4627 Stuhlproben bzw. 16 Freiwilligen höhere Viruslasten im Stuhl symptomatischer Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.<sup>1,46</sup> Eine weitere PCR-Studie zeigte höhere Viruslasten einhergehend mit länger anhaltenden Diarrhoen und verstärktem Erbrechen. In dieser Studie wurden experimentelle Infektionen von 40 Freiwilligen mit Genotyp II.4 untersucht, so dass Störgrößen durch unterschiedliche Detektierbarkeit parallel zirkulierender Genotypen ausgeschlossen waren.<sup>92</sup> Eine Evaluierungsstudie zum RIDA<sup>®</sup>QUICK NV untersuchte 728 Stuhlproben von 500 Kindern und zeigte höhere klinische Schweregrade bei Kindern mit richtig-positiven gegenüber Kindern mit falsch-negativen Befunden.<sup>69</sup> Analog wurden die Mediane des Severity Score der jeweils falsch-negativ und richtig-positiv eingeschätzten Patienten dieser Studie verglichen. Dabei war ein Trend zu höheren Severity Scores bei richtig-positiven Patienten zu beobachten, der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p=0,06$ ). In der vorliegenden Arbeit wurden die Studienpatienten durch das Kliniksetting vorselektiert, so dass der Anteil an Risikopatienten (medianes Alter 70 Jahre, Grunderkrankungen bei 88 % der Patienten) überwog und der mediane Severity Score mit 9 hoch war. Eine epidemiologische Studie aus den Niederlanden zeigte, dass nur in 5 % der akuten GE-Fälle ein Arzt konsultiert wurde, wobei diese Arztbesuche im Zusammenhang mit protrahierten Verläufen und einem Severity Score  $\geq 7$  standen.<sup>93</sup> In PCR-Studien mit 75 Patienten bzw. 2376 Stuhlproben zeigten sich jedoch vergleichbare Ct-Werte in Proben symptomatischer und asymptomatischer Personen, so dass die Höhe der Virusausscheidung im Stuhl keine zuverlässigen Rückschlüsse auf die klinische Symptomatik zulässt.<sup>32,51</sup> Auch die oben genannte Evaluierungsstudie zum RIDA<sup>®</sup>QUICK NV konnte keinen Zusammenhang zwischen Symptomdauer und Testergebnis bei den 500 Kindern zeigen.<sup>69</sup>

Eine Querschnitt-Studie untersuchte insgesamt 4627 gefrorene Stuhlproben verschiedenster GE-Patienten mit GE mittels PCR und berichtete eine inverse Korrelation zwischen Viruslast und der Anzahl von Tagen zwischen Symptombeginn und Probengewinnung.<sup>1</sup> Die Bedside-Testung einer Studienpatientin wurde einen Tag nach Symptombeginn falsch-negativ und am Folgetag richtig-negativ im Vergleich zur Referenz-PCR bewertet (Pat. 33). Mit der Frage, ob die Anzahl der Tage zwischen Symptombeginn und Probengewinnung für die Bedside-Testung – entsprechend Herstellerangaben maximal 3 Tage – das Testergebnis beeinflusst, wurden die Medianwerte der Tage zwischen Symptombeginn und Probengewinnung der jeweils falsch-negativ und richtig-positiv eingeschätzten Patienten verglichen, wobei sich kein signifikanter Unterschied zeigte.

Eine Probandenstudie untersuchte hingegen den zeitlichen Verlauf der NV-Ausscheidung im Stuhl mittels PCR und ELISA bei 16 sonst gesunden Freiwilligen, die experimentell mit Stuhlultrafiltraten Erkrankter infiziert wurden.<sup>46</sup> Die maximale Virusausscheidung wurde dabei erst nach Symptomende erreicht.<sup>46</sup> Das könnte erklären, weshalb die Referenz-PCR bei 2 Patienten erst 5 bzw. 13 Tage nach Symptombeginn positiv (Pat. 20+23) ausfiel. Die Probandenstudie zeigte zudem, dass die Antigen-Ausscheidung später einsetzte ( $m=44$  h) und kürzer andauerte ( $R=1-10$  d) als der Nachweis viraler RNA (nach  $m=36$  h; Dauer  $R=13-56$  d).<sup>46</sup> Eine Fragestellung der Studie war, ob serielle Bedside-Testungen initial falsch-negativ eingeschätzter Patienten die Sensitivität des RIDA<sup>®</sup>QUICK NV erhöhen. Systematische Verlaufsuntersuchungen falsch-negativer Bedside-Testungen ließen sich im Klinikalltag aufgrund von ambulanten Patienten, Verlegungen und verzögert eintreffenden Laborbefunden selten realisieren. Tatsächlich zeigte ein Patient (Pat. 32) 2 Tage nach initial falsch-negativer Bedside-Testung ein richtig-positives Resultat, wobei die Verlaufsprobe geringere Ct-Werte und eine höhere E zeigte. Dies spricht für einen Anstieg der Viruslast und möglicherweise war die Antigenkonzentration in der initialen Stuhlprobe noch nicht ausreichend hoch um mittels RIDA<sup>®</sup>QUICK NV detektiert zu werden. Verlaufsproben von 3 weiteren Patienten (Pat. 38, 43, 56) mit initial falsch-negativer Bedside-Testung wurden untersucht. Hierbei zeigten sich jedoch geringere Ct-Werte in den Verlaufsproben, aber nur bei einem der 3 Patienten eine höhere E und die nachfolgenden Bedside-Testungen zeigten erneut falsch-negative Ergebnisse. Aufgrund der begrenzten Zahl an seriell untersuchten Patienten und der divergenten Befunde kann somit keine eindeutige Aussage zum Einfluss serieller Testungen auf die diagnostische Sensitivität gemacht werden.

Im Rahmen einer publizierten Studie zeigten sich bei hospitalisierten Patienten Differenzen der Viruskonzentration in zwei am gleichen Tag gewonnenen Stuhlproben von bis zu 2 log-Stufen.<sup>51</sup>

Vermutlich spiegelt die Viruslast eine Momentaufnahme der Pathophysiologie im Darm wider und unterliegt starken Schwankungen, die sich nicht durch das Ausmaß der Virusreplikation sondern durch weitere Einflussfaktoren (z.B. Geschwindigkeit der Darmpassage) erklären dürften. Folglich sollten die Proben für Bedside-Testung und PCR bei zukünftigen Evaluierungsstudien konsequent aus demselben Patientenmaterial gewonnen werden.

Hochsensitive PCR-Testungen ermöglichen den Nachweis von nur 5 bis 10 Kopien viraler RNA pro Reaktionsansatz.<sup>47,68</sup> Virale RNA kann im Stuhl symptomatischer und asymptomatischer Personen mit NV-GE nachgewiesen werden, wobei unklar ist, wann die Ausscheidung als kontagiös zu betrachten ist.<sup>1,10,32,46,88</sup> Bei einem Patienten (Pat. 60) mit falsch-negativer Bedside-Testung waren Klinik (Severity Score 4) und Viruslast (Ct=36,29) gering. Eine Koinfektion mit *Clostridium difficile* wurde nachgewiesen, so dass NV mutmaßlich gar nicht Ursache der Symptomatik waren. Möglicherweise wird die Bedeutung von NV durch positive PCR-Befunde überbewertet während die weniger sensitiven Enzymimmunoassays klinisch relevante Befunde korrekter abbilden.<sup>69</sup> Folgerichtig wurde angeregt, positive PCR-Befunde anhand eines Ct-Schwellenwertes zu interpretieren.<sup>88</sup> Dies wird sowohl im Institut für Virologie der Charité (Ct-Wert  $\leq 28$  deutlich positiv,  $> 40$  fraglich) als auch im Partnerlabor der R-Biopharm AG (Ct-Wert  $\leq 26$  sicher positiv,  $> 30$  fraglich) intern angewendet. Insgesamt sollten Laborbefunde stets in Zusammenschau mit klinischen Symptomen von Patienten und der epidemiologischen Situation betrachtet werden.<sup>34,66,82</sup>

Angesichts des hohen Ausbreitungsrisikos von NV-Infektionen ist eine rasche, eindeutige Diagnose und umgehendes klinisches Handeln entscheidend. Insgesamt zeigen NV-spezifische Enzymimmunoassays eine begrenzte Sensitivität und hohe Spezifität. Somit eignen sie sich zur Diagnostik von Erkrankungen, für die eine spezifische Therapie mit erheblichen Risiken und Belastungen verbunden ist oder, wie bei NV-Infektionen, keine effektive Therapie bekannt ist. Allerdings ist die begrenzte Sensitivität des RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Tests ungünstig im Hinblick auf effektive Isolierungsmaßnahmen bei individuellen Patienten, da das Nichterkennen einer NV-GE insbesondere in Gemeinschaftseinrichtungen Übertragungen begünstigen kann. Kritisch ist dies vor Allem in Krankenhäusern oder Pflegeeinrichtungen, wo Risikopatienten durch komplikationsreiche Verläufe und in Einzelfällen letale Komplikationen gefährdet sind.<sup>30,31,44,70</sup> Eine Bestätigung negativer serologischer Testergebnisse durch die hochsensitive PCR sollte daher angestrebt werden.<sup>66,70,79</sup>

Bei Ausbrüchen mit akuter, nicht-bakterieller GE können mittels Enzymimmunoassays und insbesondere ICs mehrere Proben unmittelbar patientennah, schnell und kostengünstig getestet

werden.<sup>66,69,70</sup> Ein NV-spezifischer ELISA zeigte sich mit 88 % in Ausbruchssituationen ( $\geq 2$  positive Befunde bei epidemiologisch zusammenhängenden Proben) deutlich sensitiver, verglichen mit 50 % bei der Analyse sporadischer Fälle.<sup>87</sup> Wurden 6 statt 2 Proben verschiedener Patienten eines Ausbruchs mit ELISA getestet, so stieg die Sensitivität von 52 auf 71 % und die Wahrscheinlichkeit diesen Ausbruch als NV-bedingt zu detektieren von 57 auf 92 %.<sup>66,82</sup>

Duizer *et al.* berechneten die minimale Anzahl NV-positiver Befunde in einem definierten Probenumfang, die zur Identifikation eines NV-bedingten Ausbruchs mit hinreichender Wahrscheinlichkeit ( $p > 0,95$ ) erforderlich sind, sowie die kumulativen Wahrscheinlichkeiten, diese Probenzahl mit einem hypothetischen Goldstandard ( $se=1$ ;  $sp=1$ ), einer PCR ( $se=0,72$ ;  $sp=0,99$ ) oder einem ELISA ( $se=0,41$ ;  $sp=0,98$ ) zu detektieren.<sup>82</sup> Mit den patientenbezogenen Ergebnissen der vorliegenden Studie erfolgten analoge Berechnungen für die RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung Variante A ( $se=0,52$ ;  $sp=0,97$ ) und zum Ausschluss von Verfälschungen durch die Befundauswahl Variante B ( $se=0,5$ ;  $sp=0,53$ ). Diese Berechnungen ergaben, dass bei Testung von 4 Patienten im Rahmen eines Ausbruchs  $\geq 1$  positives Ergebnis der Bedside-Testung (A und B) für die Identifikation von NV als kausalem Erreger ausreichend ist. Werden 5 Patienten getestet, sind 2 positive Befunde der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung (A und B) notwendig. Bei diesem Berechnungsmodell steigt die minimale Anzahl positiver Befunde mit zunehmendem Probenumfang und sinkt mit abnehmender Sensitivität der Testmethode. Ebenso verhält es sich allerdings auch mit der kumulativen Wahrscheinlichkeit. So erfordern weniger sensitive Methoden zwar weniger positive Befunde, die Wahrscheinlichkeit, diese zu detektieren ist jedoch geringer. Für die Zuordnung eines klinisch verdächtigen GE-Ausbruchs als NV-bedingt mit einer kumulativen Wahrscheinlichkeit von 90 % ist die Analyse von mindestens 3 Proben mit PCR und 6 bzw.  $\geq 10$  Proben mit ELISA notwendig.<sup>82</sup> Mit der RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung müssten dagegen 4 bzw.  $\geq 8$  (Variante A) und  $\geq 8$  (B) Proben eines Ausbruchs untersucht werden. Die kumulative Wahrscheinlichkeit liegt ab Testung von 16 (Variante A) bzw. 17 (B) Proben mit RIDA<sup>®</sup>QUICK NV durchweg  $\geq 99$  %.<sup>82</sup> Stehen mehr Proben im Rahmen einer Ausbruchssituation zur Verfügung, kann auf deren Testung verzichtet werden.

Bezogen auf die RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Bedside-Testung sind die Wahrscheinlichkeiten zur Diagnostik NV-bedingter GE-Ausbrüche der weniger sensitiven Variante B ( $se=0,5$ ) geringer verglichen mit A ( $se=0,53$ ). Nur bei Testung von 12 bzw. 20 Proben verhält es sich umgekehrt, wobei nur 1 positiver Befund mehr bei Variante A notwendig ist. Prinzipiell sind die Unterschiede zwischen den beiden Varianten jedoch vergleichbar, so dass das Ergebnis durch die unter Studienbedingungen erfolgte Befundselektion bei Verlaufsuntersuchungen nicht grundlegend verändert wird. In der praktischen Anwendung, beispielsweise bei Testung im

Rahmen von Ausbrüchen in Gemeinschaftseinrichtungen oder auf Kreuzfahrtschiffen, spiegelt Variante B mit alleiniger Wertung der ersten Stuhlprobe mutmaßlich die realistischeren Testbedingungen wider.

## Literaturverzeichnis

1. Amar CFL, East CL, Gray J, Iturriza-Gomara M, Maclure EA, McLauchlin J. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26(5):311–23.
2. Zahorsky, J. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediat* (46):46: 391–395.
3. Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 2:S295–302.
4. Badger GF, Curtiss C, Dingle JH, Hodges RG, Jordan WS, McCorkle LP. A study of illness in a group of Cleveland families. XI. The occurrence of gastrointestinal symptoms. *Am J Hyg* 64, 349–356 (1956).
5. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972;10(5):1075–81.
6. Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 1969;119(6):668–73.
7. Greenberg HB, Valdesuso JR, Kalica AR, et al. Proteins of Norwalk virus. *J Virol* 1981;37(3):994–9.
8. Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990;250(4987):1580–3.
9. Patel MM, Widdowson M-A, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infect Dis* 2008;14(8):1224–31.
10. Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am* 2006;35(2):275–290, viii.
11. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2009;361(18):1776–85.
12. CDC - Norovirus Home Page. (Accessed May 29th, 2012 at <<http://www.cdc.gov/norovirus/index.html>>)
13. Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, et al. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerging Infect Dis* 2004;10(10):1827–34.
14. Johnston CP, Qiu H, Ticehurst JR, et al. Outbreak management and implications of a nosocomial norovirus outbreak. *Clin Infect Dis* 2007;45(5):534–40.

15. ICTV Virus Taxonomy: 2009 Release. (Accessed May 5th, 2012 at <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>>)
16. Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, et al. Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* 2006;87(Pt 4):909–19.
17. Zheng D-P, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346(2):312–23.
18. Siebenga JJ, Beersma MFC, Vennema H, van Biezen P, Hartwig NJ, Koopmans M. High prevalence of prolonged norovirus shedding and illness among hospitalized patients: a model for in vivo molecular evolution. *J Infect Dis* 2008;198(7):994–1001.
19. Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol* 2007;88(Pt 12):3347–59.
20. Parashar U, Quiroz ES, Mounts AW, et al. “Norwalk-like viruses”. Public health consequences and outbreak management. *MMWR Recomm Rep* 2001;50(RR-9):1–17.
21. Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(8):4538–43.
22. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol* 2010;8(3):231–41.
23. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992;66(11):6527–32.
24. Green KY, Lew JF, Jiang X, Kapikian AZ, Estes MK. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *J Clin Microbiol* 1993;31(8):2185–91.
25. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(1):15–37.
26. Caul EO. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* 1994;343(8908):1240–2.
27. Teunis PFM, Moe CL, Liu P, et al. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol* 2008;80(8):1468–76.
28. Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 2:S284–287.
29. Lopman B, Vennema H, Kohli E, et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 2004;363(9410):682–8.
30. Sawyer LA, Murphy JJ, Kaplan JE, et al. 25- to 30-nm virus particle associated with a hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission. *Am J Epidemiol* 1988;127(6):1261–71.

31. Mattner F, Sohr D, Heim A, Gastmeier P, Vennema H, Koopmans M. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(1):69–74.
32. Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol* 2007;45(12):3996–4005.
33. De Wit MAS, Widdowson MA, Vennema H, de Bruin E, Fernandes T, Koopmans M. Large outbreak of norovirus: the baker who should have known better. *J Infect* 2007;55(2):188–93.
34. Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DWG. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis* 2004;39(3):318–24.
35. Rockx B, De Wit M, Vennema H, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002;35(3):246–53.
36. Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, Lookabaugh C, Gary GW. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am J Public Health* 1982;72(12):1329–32.
37. Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis* 1990;22(3):259–67.
38. Friesema IHM, Vennema H, Heijne JCM, et al. Differences in clinical presentation between norovirus genotypes in nursing homes. *J Clin Virol* 2009;46(4):341–4.
39. Goller JL, Dimitriadis A, Tan A, Kelly H, Marshall JA. Long-term features of norovirus gastroenteritis in the elderly. *J Hosp Infect* 2004;58(4):286–91.
40. Kaufman SS, Chatterjee NK, Fuschino ME, et al. Characteristics of human calicivirus enteritis in intestinal transplant recipients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40(3):328–33.
41. Pawa N, Vanezis AP, Tutton MG. Spontaneous bowel perforation due to norovirus: a case report. *Cases J* 2009;2:9101.
42. Roddie C, Paul JPV, Benjamin R, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity. *Clin Infect Dis* 2009;49(7):1061–8.
43. Westhoff TH, Vergoulidou M, Loddenkemper C, et al. Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24(3):1051–3.
44. Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, et al. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2011;117(22):5850–6.
45. Thornhill TS, Kalica AR, Wyatt RG, Kapikian AZ, Chanock RM. Pattern of shedding of the Norwalk particle in stools during experimentally induced gastroenteritis in volunteers as determined by immune electron microscopy. *J Infect Dis* 1975;132(1):28–34.



46. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerging Infect Dis* 2008;14(10):1553–7.
47. Höhne M, Schreier E. Detection and characterization of norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. *J Med Virol* 2004;72(2):312–9.
48. Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis* 1994;170(1):34–43.
49. Tu ET-V, Bull RA, Kim M-J, et al. Norovirus excretion in an aged-care setting. *J Clin Microbiol* 2008;46(6):2119–21.
50. Murata T, Katsushima N, Mizuta K, Muraki Y, Hongo S, Matsuzaki Y. Prolonged norovirus shedding in infants <or=6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26(1):46–9.
51. Henke-Gendo C, Harste G, Juergens-Saathoff B, Mattner F, Deppe H, Heim A. New real-time PCR detects prolonged norovirus excretion in highly immunosuppressed patients and children. *J Clin Microbiol* 2009;47(9):2855–62.
52. Chan MCW, Sung JJY, Lam RKY, et al. Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerging Infect Dis* 2006;12(8):1278–80.
53. Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol* 2006;80(21):10372–81.
54. Souza M, Azevedo MSP, Jung K, Cheetham S, Saif LJ. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *J Virol* 2008;82(4):1777–86.
55. Straub TM, Höner zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, et al. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging Infect Dis* 2007;13(3):396–403.
56. Agus SG, Dolin R, Wyatt RG, Tousimis AJ, Northrup RS. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Ann Intern Med* 1973;79(1):18–25.
57. Troeger H, Loddenkemper C, Schneider T, et al. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut* 2009;58(8):1070–7.
58. Tajiri H, Kiyohara Y, Tanaka T, Etani Y, Mushiake S. Abnormal computed tomography findings among children with viral gastroenteritis and symptoms mimicking acute appendicitis. *Pediatr Emerg Care* 2008;24(9):601–4.
59. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 1977;297(2):86–9.
60. Atmar RL. Noroviruses - State of the Art. *Food Environ Virol* 2010;2(3):117–26.

61. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 2003;9(5):548–53.
62. Caul EO. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part I. The clinical and diagnostic perspective. *J Clin Pathol* 1996;49(11):874–80.
63. Hedberg CW, Osterholm MT. Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev* 1993;6(3):199–210.
64. Turcios RM, Widdowson M-A, Sulka AC, Mead PS, Glass RI. Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998-2000. *Clin Infect Dis* 2006;42(7):964–9.
65. Rabenau HF, Stürmer M, Buxbaum S, Walczok A, Preiser W, Doerr HW. Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best? *Intervirology* 2003;46(4):232–8.
66. Richards AF, Lopman B, Gunn A, et al. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol* 2003;26(1):109–15.
67. Hoehne M, Schreier E. Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infect Dis* 2006;6:69.
68. Carman WF, Niesters HG. The end of cell culture in diagnostics: is molecular diagnosis the Harry Potter or the Lord Voldemort of clinical virology as a specialty? *S Afr Med J* 2007;97(11 Pt 3):1169–76.
69. Kirby A, Gurgel RQ, Dove W, Vieira SCF, Cunliffe NA, Cuevas LE. An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immunoassays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in faecal specimens. *J Clin Virol* 2010;49(4):254–7.
70. Derrington P, Schreiber F, Day S, Curtis C, Lyon M. Norovirus Ridaquick: a new test for rapid diagnosis of norovirus. *Pathology* 2009;41(7):687–8.
71. Vinjé J, Vennema H, Maunula L, et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1423–33.
72. Thongprachum A, Khamrin P, Chaimongkol N, et al. Evaluation of an immunochromatography method for rapid detection of noroviruses in clinical specimens in Thailand. *J Med Virol* 2010;82(12):2106–9.
73. Takanashi S, Okame M, Shiota T, et al. Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroups I and II. *J Virol Methods* 2008;148(1-2):1–8.
74. Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, et al. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(10):1349–55.

75. Mutoh K, Hakamata A, Yagi H, Kurokawa K, Miki N, Kurita I. Evaluation of new commercial immunochromatography kit for norovirus in feces. *Pediatr Int* 2009;51(1):164–6.
76. Bruggink LD, Witlox KJ, Sameer R, Catton MG, Marshall JA. Evaluation of the RIDA(®)QUICK immunochromatographic norovirus detection assay using specimens from Australian gastroenteritis incidents. *J Virol Methods* 2011;173(1):121–6.
77. Ambert-Balay K, Pothier P. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples. *J Clin Virol* 2012;
78. Produktinformation zum RIDA QUICK Norovirus (N1403). Darmstadt: R-Biopharm AG, 13.11.2009.
79. Bruins MJ, Wolfhagen MJHM, Schirm J, Ruijs GJHM. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of norovirus in stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29(6):741–3.
80. Battaglioli G, Nazarian EJ, Lamson D, Musser KA, St George K. Evaluation of the RIDAQuick norovirus immunochromatographic test kit. *J Clin Virol* 2012;53(3):262–4.
81. 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. *J Virol Methods* 2008;147(2):360–3.
82. Duizer E, Pielaat A, Vennema H, Kroneman A, Koopmans M. Probabilities in norovirus outbreak diagnosis. *J Clin Virol* 2007;40(1):38–42.
83. Produktinformation zum RIDASCREEN Norovirus - 3rdGeneration (C1401). Darmstadt: R-Biopharm AG, 10.8.2010.
84. Produktinformation zum RIDA GENE Norovirus I & II (PG1415). Darmstadt: R-Biopharm AG, 4.4.2011.
85. Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, Hadley LA, Glass RI, Ando T. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2587–95.
86. Castriciano S, Luinstra K, Petrich A, et al. Comparison of the RIDASCREEN norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy. *J Virol Methods* 2007;141(2):216–9.
87. Morillo SG, Luchs A, Cilli A, et al. Norovirus 3rd Generation kit: An improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection. *J Virol Methods* 2011;173(1):13–6.
88. Phillips G, Lopman B, Tam CC, Iturriza-Gomara M, Brown D, Gray J. Diagnosing norovirus-associated infectious intestinal disease using viral load. *BMC Infect Dis* 2009;9:63.

89. Bon F, Kaplon J, Metzger M-H, Pothier P. [Evaluation of seven immunochromatographic assays for the rapid detection of human rotaviruses in fecal specimens]. *Pathol Biol* 2007;55(3-4):149–53.
90. González GG, Liprandi F, Ludert JE. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigen in fecal samples from children with sporadic acute gastroenteritis. *J Virol Methods* 2006;136(1-2):289–91.
91. Produktinformation zum RIDA QUICK Norovirus (N1402). Darmstadt: R-Biopharm AG, 26.10.2012.
92. Lee N, Chan MCW, Wong B, et al. Fecal viral concentration and diarrhea in norovirus gastroenteritis. *Emerging Infect Dis* 2007;13(9):1399–401.
93. De Wit MA, Kortbeek LM, Koopmans MP, et al. A comparison of gastroenteritis in a general practice-based study and a community-based study. *Epidemiol Infect* 2001;127(3):389–97.

## Anhang

### Eidesstattliche Versicherung

Ich, Elisabeth Katrin Weise, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluation eines Norovirus-spezifischen Bedside-Tests bei Patienten mit Gastroenteritis“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zur Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den

Elisabeth Weise

## **Publikationsliste und Anteilserklärung**

Teilergebnisse der Dissertation wurden publiziert.

Weise E, Vergoulidou M, Friedrichs B, Siedler S, Pfaffenbach S, Hofmann J, Somasundaram R, Schwartz S

Prospective evaluation of a norovirus bedside test in unselected patients with gastroenteritis  
Posterbeitrag beim 22nd European Conference of Clinical Microbiology and Infectious Diseases  
2012, London, Großbritannien

Für diesen Kongressbeitrag wurde eine erste Auswertung zu den 65 Studienpatienten vorgenommen mit deskriptiver Darstellung der klinischen Daten und Berechnung der Patientenbezogenen Testqualität (Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert). Hierfür wurden die Ergebnisse der GG II-spezifischen PCR, die am Institut für Virologie der Charité durchgeführt wurde, berücksichtigt.

Für die vorliegende Dissertation wurden weitere Daten erhoben: standardisierte Durchführung des RIDA<sup>®</sup>QUICK NV Tests unter Laborbedingungen, Durchführung des RIDA<sup>®</sup>SCREEN NV (ELISA) sowie einer Referenz-PCR RIDA<sup>®</sup>GENE NV, spezifisch für GG I und GG II, an Rückstellproben im Partnerlabor der R-Biopharm AG in Darmstadt. Neben einer erneuten, umfangreichen Analyse unter Berücksichtigung der zusätzlich erhobenen Labordaten wurde eine patientenbezogene sowie eine probenbezogene Auswertung vorgenommen. Zusätzlich wurde aus den Daten die Testzuverlässigkeit in Ausbruchssituationen analog eines publizierten, statistischen Verfahrens (Duizer E, et al. J Clin Virol 2007; 40(1):38–42) berechnet.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.





## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Stefan Schwartz und Herrn Prof. Dr. Rajan Somasundaram für die freundliche Überlassung dieses Themas und die sehr gute Betreuung in allen Abschnitten der Arbeit. Ihr Engagement und Ihre vertrauensvolle Unterstützung trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der R-Biopharm AG für die sehr gute Kooperation, Durchführung der Nachttestungen sowie stetige Bereitschaft zur Diskussion.

Desweiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern in der Rettungsstelle des Campus Benjamin Franklin, vor Allem Frau S. Pfaffenbach und Frau S. Siedler, sowie dem Pflegepersonal der kardiologischen, infektiologischen und neurochirurgischen Stationen für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung und Probensammlung.

Insbesondere danke ich den Mitarbeitern des virologischen Instituts der Charité (Hr. PD Dr. Hofmann, Fr. Dr. Stein) für die Durchführung und Erläuterungen zur PCR sowie der steten Bereitschaft zur Unterstützung durch Auskünfte, Diskussionen und Testungen.

Herrn Klaus Lenz vom Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité und Herrn Erwin Duizer vom Center for Infectious Diseases Control des National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Bilthoven, Niederlande) bin ich für die statistische Beratung und Unterstützung bei den Berechnungen sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung meiner gesamten bisherigen Ausbildungszeit und während der Anfertigung dieser Arbeit. Ebenfalls bedanke ich mich bei meiner Familie und allen Freunden, die mich unterstützt und immer wieder aufgebaut haben, wenn es mal nicht so gut lief.

## Datentabellen

## A: Tabellarische Übersicht der 93 untersuchten Proben

Probe	Pat.	Datum	Material	RIDA® QUICK NV Bedside- Testung	PCR, Institut für Virologie, Charité (Ct)		RIDA® GENE NV (Ct)		RIDA® QUICK NV Nach- testung	RIDA® SCREEN NV E <sup>c</sup>	
					GG II	PK	GG I <sup>a</sup>	GG II <sup>b</sup>			
1	51	29.03.11	S	(pos)	24,77	32,85	neg	32,74	pos	pos	4,062
2	43	11.03.11	S	neg	19,69	33,57	neg	29,32	pos	pos	3,985
3	38	05.02.11	S	2x neg	27,23	33,44	neg	34,79	(pos)	neg	0,075
4	31	11.01.11	S	neg	neg	33,13	25,21	neg	neg	pos	0,725
5	23	05.01.11	S	-	22,34	32,94	neg	neg	-	-	-
6	19	01.01.11	E	neg	27,30	33,67	neg	29,93	(pos)	neg	0,075
7	13	12.12.10	S	neg	neg	33,12	neg	neg	neg	neg	0,059
8	7	19.11.10	S	2x pos	20,44	33,07	neg	27,67	pos	pos	3,915
9	1	14.10.10	S	2x neg	neg	33,73	neg	neg	-	-	-
10	52	29.03.11	S	pos	23,84	33	neg	26,17	neg	neg	0,117
11	44	15.03.11	S	neg	neg	34,06	neg	neg	neg	neg	0,060
12	38	05.02.11	E	neg	36,73	33,44	neg	neg	neg	neg	0,061
13	32	12.01.11	S	neg	22,92	34,65	neg	33,82	pos	pos	1,023
14	23	08.01.11	S	-	18,95	33,94	neg	28,92	pos	pos	3,747
15	20	02.01.11	S	pos	neg	33,67	neg	neg	neg	neg	0,059
16	14	30.12.10	S	neg	neg	33,03	neg	neg	neg	neg	0,055
17	8	16.11.10	S	-	17,25	33,99	neg	31,3	neg	pos	0,828
18	2	16.10.10	S	neg	neg	34,85	neg	neg	neg	neg	0,058
19	53	29.03.11	S	(pos)	24,70	33,3	neg	33,57	pos	pos	0,271
20	45	17.03.11	IS	neg	neg	33,63	neg	neg	neg	neg	0,070
21	38	06.02.11	S	neg	25,68	33,05	neg	33,66	neg	neg	0,056
22	32	14.01.11	S	2x (pos)	17,24	32,96	neg	20,93	pos	pos	4,095
23	24	03.01.11	S	neg	neg	32,95	neg	neg	neg	neg	0,061
24	20	03.01.11	S	-	neg	33,67	neg	neg	neg	neg	0,053
25	14	03.01.11	S	-	neg	33,67	neg	neg	neg	neg	0,058
26	8	16.11.10	S	-	17,72	33,99	neg	31,6	pos	pos	3,893
27	2	19.10.11	S	-	neg	33,55	neg	neg	neg	neg	0,057
28	54	29.03.11	S	(pos)	25,85	33,3	neg	31,76	neg	pos	0,206
29	46	17.03.11	S	pos	22,47	33,63	neg	29,98	neg	pos	0,928
30	39	03.03.11	S	neg	neg	34,26	neg	neg	neg	neg	0,058
31	33	14.01.11	S	neg	28,09	32,96	neg	31,77	(pos)	neg	0,054
32	25	04.01.11	S	neg	neg	33,28	neg	neg	neg	neg	0,049
33	20	14.01.11	S	-	37,67	32,96	neg	neg	neg	neg	0,049
34	15	30.12.10	S	neg	25,73	33,03	neg	29,78	neg	-	-
35	8	22.11.10	S	-	25,73	33,07	neg	34,66	-	-	-
36	3	28.10.10	S	neg	neg	33,46	neg	neg	neg	pos	0,374
37	54	30.03.11	S	-	24,08	34,73	neg	28,92	pos	pos	1,261
38	47	22.03.11	S	neg	neg	33,06	neg	neg	neg	neg	0,049
39	39	07.03.11	S	-	neg	34,83	neg	neg	neg	neg	0,058
40	33	15.01.11	S	neg	neg	33,63	neg	neg	neg	neg	0,055
41	26	05.01.11	S	neg	neg	32,94	neg	neg	neg	neg	0,055
42	20	02.01.11	E	(pos)	16,78	33,67	neg	25,16	pos	pos	3,863
43	16	30.12.10	S	pos	19,14	33,03	neg	23,8	pos	pos	3,858
44	9	21.11.10	S	neg	neg	33,07	neg	neg	neg	neg	0,054
45	4	02.11.10	S	(pos)	17,65	33,73	neg	32,69	pos	pos	4,016

Anhang

Probe	Pat.	Datum	Material	RIDA® QUICK NV Bedside- Testung	PCR, Institut für Virologie, Charité (Ct)		RIDA® GENE NV (Ct)		RIDA® QUICK NV Nach- testung	RIDA® SCREEN NV	
					GG II	PK	GG I <sup>a</sup>				E <sup>c</sup>
46	55	30.03.11	S	neg	neg	34,72	neg	neg	neg	neg	0,052
47	48	22.03.11	S	neg	neg	33,06	neg	neg	neg	neg	0,042
48	40	06.03.11	S	neg	25,54	34,83	neg	29,25	pos	pos	1,307
49	34	15.01.11	S	neg	22,63	33,47	neg	35	-	-	-
50	27	06.01.11	S	neg	neg	32,8	neg	neg	neg	neg	0,041
51	21	01.01.11	S	neg	neg	33,67	neg	neg	neg	neg	0,043
52	17	03.01.11	S	neg	24,09	33,67	neg	27,09	neg	neg	0,044
53	10	25.11.10	S	-	neg	34,09	neg	neg	neg	neg	0,044
54	4	04.11.10	S	-	17,25	35,47	neg	25,06	pos	pos	3,997
55	55	31.03.11	S	neg	neg	34,72	neg	neg	neg	neg	0,045
56	49	28.03.11	S	neg	29,92	32,85	neg	32,19	neg	neg	0,044
57	41	09.03.11	S	2x (pos)	26,44	33,88	neg	31,76	-	-	-
58	35	17.01.11	S	2x (pos)	20,92	33,43	neg	28,43	pos	pos	1,552
59	28	07.01.11	S	neg	neg	33,94	neg	neg	neg	neg	0,045
60	22	02.01.11	S	(pos)	neg	32,95	neg	32,71	(pos)	pos	0,651
61	18	31.12.11	IS	neg	35,74	33,67	neg	neg	neg	neg	0,047
62	10	26.11.11	S	neg	neg	33,34	neg	neg	(pos)	neg	0,051
63	4	15.11.10	S	-	19,3	33,56	neg	27,24	pos	pos	3,863
64	55	05.04.11	S	-	neg	33,48	neg	neg	(pos)	neg	0,049
65	50	27.03.11	S	(pos)	18,29	32,85	neg	27,86	pos	pos	3,902
66	42	10.03.11	S	neg	neg	33,88	neg	neg	neg	neg	0,046
67	36	19.01.11	S	pos	39,19	33,63	neg	31,83	pos	pos	3,905
68	29	08.01.11	S	neg	neg	33,94	neg	neg	neg	neg	0,049
69	23	30.12.11	S	-	neg	33,67	neg	neg	neg	neg	0,050
70	18	03.01.11	IS	-	31,48	33,67	neg	38,8	neg	neg	0,049
71	11	08.12.10	S	neg	neg	33,64	neg	neg	neg	neg	0,058
72	5	07.11.10	S	neg	neg	34,06	neg	neg	neg	neg	0,050
73	56	31.03.11	S	neg	31,69	34,73	neg	34,27	neg	neg	0,053
74	50	03.04.11	S	-	23,47	33,48	neg	33,77	(pos)	pos	0,644
75	43	10.03.11	S	neg	25,67	33,88	neg	29,84	neg	neg	0,051
76	37	05.02.11	S	neg	neg	33,44	neg	neg	neg	neg	0,052
77	30	11.01.11	S	neg	neg	33,13	neg	neg	neg	neg	0,052
78	23	03.01.11	S	neg	neg	32,95	neg	28,38	pos	pos	1,558
79	19	03.01.11	S	(pos)	33,50	33,28	neg	26,62	pos	pos	3,832
80	12	08.12.10	S	neg	neg	33,64	neg	neg	neg	neg	0,047
81	6	18.11.10	S	neg	neg	33,07	neg	neg	neg	neg	0,048
82	56	02.04.11	S	neg	29,77	33,48	neg	neg	neg	neg	0,040
83	57	02.04.11	S	neg	neg	34,14	neg	neg	neg	neg	0,045
84	58	04.04.11	S	neg	neg	34,18	21,67	neg	neg	-	-
85	59	05.04.11	S	-	neg	34,18	neg	neg	neg	-	-
86	59	05.04.11	S	neg	neg	34,18	neg	neg	neg	neg	0,047
87	60	05.04.11	S	neg	36,29	34,18	neg	neg	neg	neg	0,055
88	61	06.04.11	S	(pos)	19,01	33,53	neg	31,51	pos	pos	3,844
89	62	08.04.11	S	neg	neg	33,98	neg	neg	neg	neg	0,046
90	63	10.04.11	S	-	neg	33,98	neg	neg	neg	neg	0,043
91	63	11.04.11	S	neg	neg	-	neg	neg	neg	neg	0,044
92	64	07.06.11	S	neg	neg	34,18	27,45	neg	neg	neg	0,044
93	65	08.06.11	S	neg	neg	33,42	neg	neg	neg	-	-

<sup>a-c</sup> Ct der Positivkontrolle (PK) <sup>a</sup>27,5; <sup>b</sup>28,8; <sup>c</sup>3,955 (bei Cut-off: 0,184 - 0,224)

pos = positiv; (pos) = schwach positiv; neg = negativ; S = Stuhl; E = Erbrochenes; IS = Ileostoma

**B: Tabellarische Übersicht der 65 Studienpatienten**

Pat.	Alter	Sex	Wertung	Severity Score	Beginn der Symptome	Probe	Material	Proben- datum	RIDA® QUICK NV Bedside- Testung	PCR GG II, Institut für Virologie, Charité (Ct) <sup>d</sup>	RIDA® GENE NV (Ct)		RIDA® QUICK NV Nach- testung	RIDA® SCREEN NV (E) <sup>c</sup>	Anmerkungen
											GG I <sup>a</sup>	GG II <sup>b</sup>			
1	68	w	R neg	13	12.10.2010	9	S	14.10.2010	2x neg	neg	neg	neg	-	-	
2	52	w	R neg	12	03.10.2010	18	S	16.10.2010	neg	neg	neg	neg	neg	0,057	Clostrid. diff. A/B pos
						27	S	19.10.2010	-	neg	neg	neg	neg	0,058	
3	35	m	R neg	9	26.10.2010	36	S	28.10.2010	neg	neg	neg	neg	0,374	Reiseanamnese	
4	59	w	R pos	13	31.10.2010	45	S	02.11.2010	(pos)	17,65	neg	32,69	pos	4,016	
						54	S	04.11.2010	-	17,25	neg	25,06	pos	3,997	
						63	S	15.11.2010	-	19,3	neg	27,24	pos	3,863	
5	92	w	R neg	6	07.11.2010	72	S	07.11.2010	neg	neg	neg	neg	0,05		
6	56	w	R neg	8	16.11.2010	81	S	18.11.2010	neg	neg	neg	neg	0,048		
7	78	w	R pos	11	19.11.2010	8	S	19.11.2010	2x pos	20,44	neg	27,67	pos	3,915	
8	80	w	R pos	5	15.11.2010	17	S	16.11.2010	-	17,25	neg	31,3	neg	0,828	Lagerung über Nacht
						26	S	16.11.2010	-	17,72	neg	31,6	pos	3,893	
						-	S	20.11.2010	2x (pos)	-	-	-	-	-	
						35	S	22.11.2010	-	25,73	neg	34,66	-	-	
9	91	w	R neg	6	20.11.2010	44	S	21.11.2010	neg	neg	neg	neg	0,054		
10	51	m	R neg	8	25.11.2010	62	S	26.11.2010	neg	neg	neg	neg	(pos)	0,051	
						53	S	25.11.2010	-	neg	neg	neg	neg	0,044	
11	69	w	R neg	12	05.12.2010	71	S	08.12.2010	neg	neg	neg	neg	0,058		
12	70	m	R neg	8	05.12.2010	80	S	08.12.2010	neg	neg	neg	neg	0,047	Camp. jejuni pos	
13	72	w	R neg	12	10.12.2010	7	S	12.12.2010	neg	neg	neg	neg	0,059	Rotavirus pos	
14	96	w	R neg	14	24.12.2010	16	S	30.12.2010	neg	neg	neg	neg	neg	0,055	
						25	S	03.01.2011	-	neg	neg	neg	neg	0,058	
15	69	m	F neg	4	28.12.2010	34	S	30.12.2010	neg	25,73	neg	29,78	neg	-	
16	88	m	R pos	9	29.12.2010	43	S	30.12.2011	pos	19,14	neg	23,8	pos	3,858	
17	85	m	F neg	8	30.12.2010	52	S	31.12.2010	neg	24,09	neg	27,09	neg	0,044	
18	76	w	F neg	5	29.12.2010	61	IS	31.12.2010	neg	35,74	neg	neg	neg	0,047	
						70	IS	03.01.2011	-	31,48	neg	38,8	neg	0,049	
19	67	w	R pos	4	01.01.2011	6	E	01.01.2011	neg	27,3	neg	29,93	(pos)	0,075	fest
						79	S	03.01.2011	(pos)	33,5	neg	26,62	pos	3,832	
20	76	m	R pos	10	01.01.2011	15	S	02.01.2011	pos	neg	neg	neg	neg	0,059	
						42	E	02.01.2011	(pos)	16,78	neg	25,16	pos	3,863	
						24	S	03.01.2011	-	neg	neg	neg	neg	0,053	

Anhang

Pat.	Alter	Sex	Wertung	Severity Score	Beginn der Symptome	Probe	Material	Proben- datum	RIDA® QUICK NV Bedside- Testung	PCR GG II, Institut für Virologie, Charité (Ct) <sup>d</sup>	RIDA® GENE NV (Ct)		RIDA® QUICK NV Nach- testung	RIDA® SCREEN NV (E) <sup>c</sup>	Anmerkungen
											GG I <sup>a</sup>	GG II <sup>b</sup>			
											neg	neg			
21	46	w	R neg	16	29.12.2010	51	S	01.01.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,043	
22	67	m	F pos	6	01.01.2011	60	S	02.01.2011	(pos)	neg	neg	32,71	(pos)	0,651	
23	78	w	F neg	8	30.12.2010	69	S	30.12.2010	-	neg	neg	neg	neg	0,05	
						78	S	03.01.2011	neg	neg	neg	28,38	pos	1,558	
						5	S	05.01.2011	-	22,34	neg	neg	-	-	
						14	S	08.01.2011	-	18,95	neg	28,92	pos	3,747	
24	84	m	R neg	2	03.01.2011	23	S	03.01.2011	neg	neg	neg	neg	0,061		
25	85	w	R neg	7	03.01.2011	32	S	04.01.2011	neg	neg	neg	neg	0,049		
26	92	w	R neg	6	04.01.2011	41	S	05.01.2011	neg	neg	neg	neg	0,055		
27	88	w	R neg	8	05.01.2011	50	S	06.01.2011	neg	neg	neg	neg	0,041		
28	51	w	R neg	8	06.01.2011	59	S	07.01.2011	neg	neg	neg	neg	0,045		
29	77	w	R neg	7	20.12.2010	68	S	08.01.2011	neg	neg	neg	neg	0,049		
30	58	w	R neg	13	03.01.2011	77	S	11.01.2011	neg	neg	neg	neg	0,052	fest	
31	25	m	F neg	9	11.01.2011	4	S	11.01.2011	neg	neg	25,21	neg	neg	0,725	
32	83	m	R pos	12	12.01.2011	13	S	12.01.2011	neg	22,92	neg	33,82	pos	1,023	
						22	S	14.01.2011	2x (pos)	17,24	neg	20,93	pos	4,095	
33	30	w	F neg	16	13.01.2011	31	S	14.01.2011	neg	28,09	neg	31,77	(pos)	0,054	
						40	S	15.01.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,055	
34	23	w	F neg	14	14.01.2011	49	S	15.01.2011	neg	22,63	neg	35	-	-	
35	77	m	R pos	9	16.01.2011	58	S	17.01.2011	2x (pos)	20,92	neg	28,43	pos	1,552	
36	30	w	R pos	11	17.01.2011	-	S	18.01.2011	2x (pos)	-	-	-	-	-	
						67	S	19.01.2011	pos	39,19	neg	31,83	pos	3,905	
37	40	m	R neg	9	02.02.2011	76	S	05.02.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,052	
38	85	w	F neg	13	05.02.2011	3	S	05.02.2011	2x neg	27,23	neg	34,79	(pos)	0,075	Lag. über Nacht, fest Lagerung über Nacht
						12	E	05.02.2011	neg	36,73	neg	neg	neg	0,061	
						21	S	06.02.2011	neg	25,68	neg	33,66	neg	0,056	
39	85	w	R neg	6	02.03.2011	30	S	03.03.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,058	
						39	S	07.03.2011	-	neg	neg	neg	neg	0,058	
40	38	m	F neg	9	05.03.2011	48	S	06.03.2011	neg	25,54	neg	29,25	pos	1,307	
41	27	w	R pos	11	09.03.2011	57	S	09.03.2011	2x (pos)	26,44	neg	31,76	-	-	Lagerung über Nacht
42	51	m	R neg	9	10.03.2011	66	S	10.03.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,046	
43	68	m	F neg	10	10.03.2011	75	S	10.03.2011	neg	25,67	neg	29,84	neg	0,051	Reiseanamnese

Anhang

Pat.	Alter	Sex	Wertung	Severity Score	Beginn der Symptome	Probe	Material	Proben-datum	RIDA® QUICK NV Bedside-Testung	PCR GG II, Institut für Virologie, Charité (Ct) <sup>d</sup>	RIDA® GENE NV (Ct)		RIDA® QUICK NV Nach-testung	RIDA® SCREEN NV (E) <sup>c</sup>	Anmerkungen
											GG I <sup>a</sup>	GG II <sup>b</sup>			
											neg	29,32			
44	53	m	R neg	7	11.03.2011	11	S	15.03.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,06	
45	49	m	R neg	12	12.03.2011	20	IS	17.03.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,07	
46	67	m	R pos	10	17.03.2011	29	S	17.03.2011	pos	22,47	neg	29,98	neg	0,928	
47	71	m	R neg	5	21.03.2011	38	S	22.03.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,049	
48	79	w	R neg	18	20.03.2011	47	S	22.03.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,042	
49	48	m	F neg	3	27.03.2011	56	S	28.03.2011	neg	29,92	neg	32,19	neg	0,044	
50	66	m	R pos	10	26.03.2011	65	S	27.03.2011	(pos)	18,29	neg	27,86	pos	3,902	
						74	S	03.04.2011	-	23,47	neg	33,77	(pos)	0,644	
51	90	m	R pos	9	26.03.2011	-	S	28.03.2011	(pos)	-	-	-	-	-	Lagerung über Nacht
						1	S	29.03.2011	pos	24,77	neg	32,74	pos	4,062	
52	49	m	R pos	6	27.03.2011	10	S	29.03.2011	pos	23,84	neg	26,17	neg	0,117	Lagerung über Nacht
53	72	m	R pos	12	28.03.2011	19	S	29.03.2011	(pos)	24,7	neg	33,57	pos	0,271	Lagerung über Nacht
54	77	m	R pos	9	29.03.2011	28	S	29.03.2011	(pos)	25,85	neg	31,76	neg	0,206	fest
						37	S	30.03.2011	-	24,08	neg	28,92	pos	1,261	
55	61	m	R neg	15	29.03.2011	46	S	30.03.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,052	Lagerung über Nacht
						55	S	31.03.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,045	
						64	S	05.04.2011	-	neg	neg	neg	(pos)	0,049	
56	72	m	F neg	4	31.03.2011	73	S	31.03.2011	neg	31,69	neg	34,27	neg	0,053	fest
						82	S	02.04.2011	neg	29,77	neg	neg	neg	0,04	
57	70	m	R neg	6	01.04.2011	83	S	02.04.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,045	
58	70	w	F neg	15	02.04.2011	84	S	04.04.2011	neg	neg	21,67	neg	neg	-	fest
59	76	m	R neg	6	03.04.2011	85	S	05.04.2011	-	neg	neg	neg	neg	-	Rotavirus pos
						86	S	05.04.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,047	
60	89	m	F neg	4	05.04.2011	87	S	05.04.2011	neg	36,29	neg	neg	neg	0,055	Clostrid. diff. A/B pos
61	20	m	R pos	9	06.04.2011	88	S	06.04.2011	(pos)	19,01	neg	31,51	pos	3,844	
62	49	m	R neg	11	08.04.2011	89	S	08.04.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,046	Lagerung über Nacht
63	73	w	R neg	14	09.04.2011	90	S	10.04.2011	-	neg	neg	neg	neg	0,043	Lagerung über Nacht
						91	S	11.04.2011	neg	neg	neg	neg	neg	0,044	
64	24	m	F neg	13	06.06.2011	92	S	07.06.2011	neg	neg	27,45	neg	neg	0,044	
65	71	m	R neg	12	08.06.2011	93	S	08.06.2011	neg	neg	neg	neg	neg	-	

<sup>a-d</sup> Ct der Positivkontrolle (PK) <sup>a</sup>27,5; <sup>b</sup>28,8; <sup>c</sup>3,955 (bei Cut-off: 0,184 - 0,224), <sup>d</sup>m=24,395 (R 16,78- 39,19)  
 pos = positiv; (pos) = schwach positiv; neg = negativ; R = richtig; F = falsch; S = Stuhl; E = Erbrochenes; IS = Ileostoma