

USO INDICADO

La prueba rápida para la detección de Norovirus GI + GII (heces) es un inmunoensayo para la detección directa, cualitativa y diferencial de antígenos de norovirus GI y GII en materia fecal humana. Esta prueba es útil para el diagnóstico de infección por norovirus. Resultados negativos no descartan la posible infección por norovirus, y deben ser confirmados por ensayos moleculares. La prueba es para uso profesional exclusivamente.

INTRODUCCION

Los norovirus son la principal causa no bacteriana de brotes de gastroenteritis en niños y adultos en todo el mundo, clasificado como el segundo agente viral más común de diarreas esporádicas en todos los grupos de edades. Una infección viral puede afectar más severamente a los adultos mayores, jóvenes y pacientes inmunocomprometidos. Los norovirus, pertenecientes a la familia Caliciviridae, comprenden un grupo de RNA virus genéticamente diversos con virus de cadena simple de RNA. Estos se dividen en cinco genogrupos (G), de los cuales solo tres (GI, GII y GIV) son patógenos en humanos con el genotipo GI.4, responsables de la mayoría de infecciones por norovirus a nivel mundial. Los norovirus comúnmente aislados en casos de gastroenteritis aguda pertenecen a dos genogrupos: GI incluyendo el virus Norwalk, virus Desert Shield y virus Southampton, y GII, que incluye el virus de Bristol, virus Lordsdale, virus Toronto, virus Mexico, virus Hawáii y virus Snow Mountain.

Luego de un periodo de incubación de 1 a 3 días, las manifestaciones clínicas se caracterizan por diarrea duradera entre 12 a 60 hs., y se asocia frecuentemente con una variedad de otros síntomas como cólico abdominal agudo, náuseas, vómitos. Síntomas menos comunes que se han reportado incluyen dolor de cabeza, febrículas, dolores musculares y fatiga. Los patógenos pueden contagiarse de persona a persona por la vía fecal-oral, a través del vomito, como también es reconocida la transmisión por la comida y el agua.

Por muchos años, los Norovirus fueron diagnosticados por microscopía electrónica, pero más recientemente por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa, (RT-PCR), que realzan la sensibilidad de la detección, convirtiéndose en el método standard para el diagnóstico de norovirus. Sin embargo, RT-PCR es un método costoso, que insume tiempo, y requiere de personal experimentado y equipamiento sofisticado, que no están habitualmente disponibles en la mayoría de los laboratorios de biología clínica, o en los hospitales. Además, la especificidad clínica de la prueba RT-PCR es a menudo pobre, como la PCR puede detectar el desprendimiento asintomático de norovirus por un promedio de 28 días luego de la infección. No se recomiendan muestras de suero para diagnosticar norovirus. Si es factible y justificado para estudios especiales, podrán recolectarse muestras de suero en pacientes en periodo agudo, y en fase convaleciente, y analizarlos para un aumento de más de cuatro veces en el título de IgG de norovirus. Mientras tanto, un número de inmunoensayos enzimáticos comerciales (EIA), y kits de inmunocromatografía han sido liberados al mercado.

Debido a la simplicidad y rapidez, la cual sería valiosa durante las investigaciones en brotes, estas metodologías han sido descritas como un

atractivo suplemento para los métodos RT-PCR. La prueba rápida para la detección de Norovirus GI+GII (heces) es un inmunoensayo cualitativo de flujo lateral, para la detección y diferenciación de GI y GII norovirus en muestras de materia fecal humana. La prueba es específica para antígenos de norovirus con reactividad no cruzada con la flora intestinal normal y otros patógenos.

PRINCIPIO

La prueba rápida para la detección de Norovirus GI + GII (heces) detecta antígenos de Norovirus GI y GII a través de una interpretación visual de desarrollo de color en la tira interna del dispositivo. Los anticuerpos GI y GII se encuentran inmovilizados en la región de la muestra T1 y T2 respectivamente. La muestra de materia fecal es agregada al tubo de dilución con buffer para extraer los antígenos de norovirus GI y/o GII de la muestra. Durante el análisis, los antígenos extraídos se unen a los anticuerpos anti-norovirus GI y GII conjugados a las partículas coloreadas en la zona de la muestra. Al migrar la mezcla a través de la membrana por capilaridad e interactuar con los reactivos en la membrana, el complejo será capturado por los anticuerpos anti-norovirus GI y GII hacia la respectiva zona de detección. El exceso de partículas coloreadas es capturado en la zona interna de control.

La presencia de dos línea(s) roja(s) en la zona de la muestra T1 y/o T2 indica un resultado positivo para antígenos virales particulares, mientras que su ausencia indica un resultado negativo. La presencia de una línea coloreada en la zona de control de la membrana sirve como procedimiento de control, indicando que un correcto volumen de muestra ha sido utilizado y que la prueba funciona correctamente.

MATERIALES

Materiales suministrados

Caja conteniendo:

- 25 cassettes
- 25 tubos aplicadores con buffer
- 1 Ficha técnica

Material requerido no suministrado

- Cronómetro
- Centrífuga
- Recipiente recolector de muestra

ADVERTENCIA

- Solo para Diagnóstico de Uso "In Vitro". No utilizar después de su fecha de vencimiento.
- No utilizar el dispositivo si el envase se encuentra dañado. No reutilizar los dispositivos.
- No comer, beber o fumar en el área de trabajo mientras las muestras están siendo procesadas.
- Este kit contiene productos de origen animal. El certificado del origen del estado sanitario de los animales no garantiza completamente la ausencia de agentes patógenos de transmisión. Considerar todas los productos como potencialmente infecciosos (no ingerir ni inhalar). Observe las precauciones establecidas contra los riesgos microbiológicos (bioseguridad) y siga los procedimientos estándares

establecidos para el desecho adecuado de las muestras.

- Los dispositivos son envasados en pouch que los aíslan de la humedad durante su almacenamiento. Inspeccione cada uno antes de abrirlo. No utilice dispositivos que presenten orificios en el envase, o que no se encuentren perfectamente sellados. Resultados erróneos pueden ocurrir si los componentes y reactivos no son almacenados adecuadamente.
- No utilizar el buffer de dilución si se encuentra turbio o decolorado. Estos pueden ser signos de contaminación microbiana.
- Todas las muestras de los pacientes deben ser tratadas y descartadas como de riesgo biológico. Las muestras deben ser mezcladas completamente antes de analizarse para asegurar una muestra representativa.
- Tomar los cuidados de almacenamiento de las muestras, como les indica en la ficha técnica.
- El no llevar las muestras y reactivos a temperatura ambiente antes de su uso pueden disminuir la sensibilidad de la prueba. Una recolección incorrecta de la muestra, almacenamiento y transporte pueden ocasionar resultados falsos negativos.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- El kit debe ser almacenado en su envase original a temperatura ambiente o refrigerado (entre 2 y 30° C) hasta la fecha de vencimiento impresa en el envase.
- El dispositivo debe permanecer en su envase hasta ser utilizado.
- NO CONGELAR.
- Evitar la contaminación de los componentes de este kit. No utilizar si hay evidencia de contaminación microbiana o precipitado.

PROCEDIMIENTO

Lleve el cassette, la muestra y/o los controles a temperatura ambiente (15-30° C) antes de su uso.

1.Recolección y pre tratamiento de las muestras:

1. Utilice recipientes secos y limpios para al toma de muestra. Para mejores resultados, la prueba debe realizarse en el transcurso de 1 hora de recolectada.

Nota: Las muestras recolectadas en su recipiente pueden ser almacenadas por 1-2 días a 2-8°C, o por 6 meses a -20°C si no se analizan dentro de una hora luego de la preparación.

2. Para especímenes sólidos: Desenrosque y remueva el tubo aplicador de dilución. Evite derramar o salpicar la solución del tubo. Recolecte la muestra insertando el aplicador en tres lugares distintos de la materia fecal, obteniendo aproximadamente 50 mg. de materia fecal.

Para especímenes líquidos: Sostenga la pipeta en posición vertical, aspire la muestra de materia fecal y transfiera 100µl. dentro del tubo de recolección, con el buffer de dilución.

3. Coloque el aplicador nuevamente dentro del tubo y enrosque la tapa. Evite romper la punta del tubo de dilución.

4. Agite vigorosamente el tubo de recolección para mezclar la muestra con el buffer extractor.

2. Análisis de las muestras:

1. Saque el cassette del envase sellado y colóquelo sobre una superficie limpia y nivelada. Rotule el cassette con los datos del paciente. Para obtener mejores resultados, analizar la muestra dentro de 1 hora.

2. Rompa la punta del tubo de dilución usando papel tissue. Sostenga el tubo en forma vertical y dispense 2 gotas de la solución en el pocillo de la muestra (S) del cassette Evite la formación de burbujas en el pocillo de muestra (S).

3. Espere la aparición de banda(s) coloreada(s). El resultado debe leerse a los 10 minutos. No interpretar los resultados a los 20 minutos.

NOTA: si la muestra no migra (por presencia de partículas), centrifugue la muestra extractada en el tubo de recolección. Tome 100-120µl. del sobrenadante y dispénelo en el pocillo de muestra (S) de un nuevo cassette, y siga las instrucciones mencionadas anteriormente.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

POSITIVO para GI + GII : una línea verde aparecera en la región de la línea de Control (C) y otras dos líneas rojas aparecerán en ambas zonas T1 y T2 en la región de línea de prueba

POSITIVO para GI: una línea verde aparecerá en la región de la línea de Control (C), y una línea roja aparecerá en la zona de la muestra T1.

POSITIVO para GII: una línea verde aparecerá en la región de la línea de Control (C), y una línea roja aparecerá en la zona de la muestra T2.

NEGATIVO: Una línea verde aparecerá en la región de la línea de control (C). No debe aparecer ninguna línea coloreada en la region de prueba T1 ni T2.

NO VÁLIDO: No aparece la línea verde en la región de la línea de control (C), estén o no presentes líneas en la zona de la muestra. Volúmenes insuficientes de muestra o técnicas de procedimiento incorrectos son las causas principales. Revise el procedimiento y repita la prueba utilizando una nueva tira de prueba. Si el problemas persiste, deje de usar la prueba inmediatamente y contacte a su distribuidor local.

Figura 1: Interpretación de los resultados

RESULTADO POSITIVO:



RESULTADO INVÁLIDO:



RESULTADO NEGATIVO:



CONTROL DE CALIDAD

Control de Calidad Interno

Los controles de procedimiento están incluidos en la prueba. Una línea coloreada verde aparecerá en la región de la línea de control (C) el cual es un control interno de procedimiento. Esto confirma un volumen de muestra suficiente y un procedimiento correcto.

Control de Calidad Externo

Este kit no proporciona controles externos. Como buena práctica de laboratorio se recomienda el uso de materiales de control para verificar el funcionamiento apropiado del kit.

LIMITACIONES

- La prueba rápida para la detección de Norovirus GI + GII (heces) está únicamente indicada para el Diagnóstico de Uso "In Vitro", y debe ser usada para una detección cualitativa de norovirus GI y GII exclusivamente.
- El diagnóstico clínico no debe basarse únicamente en el resultado de la prueba rápida. Un contexto clínico completo del paciente debe ser incluido cuando se toma una decisión diagnóstica, teniendo en cuenta los síntomas clínicos y otra información relevante.
- Un seguimiento incorrecto del procedimiento y la interpretación de los resultados pueden afectar adversamente, o invalidar el desempeño de la prueba.
- Un efecto de prozona puede ocurrir cuando la intensidad del color de la banda disminuye, cuando la concentración de antígeno aumenta. Si se sospecha de efecto prozona, la dilución de la muestra puede aumentar la intensidad del color de la banda de la muestra.

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Sensibilidad y Especificidad Clínica

Un total de 398 muestras de materia fecal de pacientes fueron analizadas con la prueba rápida para la detección norovirus GI y GII, en comparación con otras pruebas comerciales inmunocromatográficas para norovirus GI y GII. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Referencia	Prueba rápida Norovirus GI+GII		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	142	3	145
Negativo	1	252	253
Total	143	255	398

Sensibilidad Relativa: 97,9% (94,1% ~ 99,3%)*

Especificidad relativa: 99,6% (97,8%~99,9%)*

Concordancia total: 99,0% (97,4%~99,6%)*

***95% Intervalo de fiabilidad**

Precisión:

La precisión de la prueba rápida para la detección de norovirus GI y GII se midió en base a la reproductibilidad intra-ensayo (10 repeticiones/ 1 día/ 1 operador/ 1 lote), la reproductibilidad inter día (3 repeticiones/ 10 días/ 1 operador/ 1 lote), la reproductibilidad intra operador (3 repeticiones/1 día/ 3 operadores/ 1 lote), y la reproductibilidad intra lote (3 repeticiones/ 1 día/ 1 operador/ 3 lotes). Tres referencias se midieron para cada prueba: una negativa, una positiva, una débil positiva, y una moderadamente positiva. La prueba rápida para la detección de norovirus GI y GII tuvo un rendimiento esperado en todas las mediciones.

Reactividad cruzada:

Se estudio la reactividad cruzada de los siguientes organismos a 1,0 x10⁹ organismos/ml. Los siguientes organismos no mostraron reactividad cruzada cuando se analizaron con la prueba rápida para la detección de norovirus GI y GII.

Staphylococcus aureus	Neisseria meningitidis	Hemophilus influenzae
Proteus mirabilis	Candida albicans	Branhamella catarrhalis
Neisseria gonorrhoea	Streptococcus Grupo C	E. coli
Pseudomonas aeruginosa	Gardenerella vaginalis	Adenovirus
Helicobacter pylori	Enterococcus faecium	Chlamydia trachomatis
Streptococcus del Grupo B	Klebsiella pneumoniae	Rotavirus
Enterococcus faecalis	Acinetobacter calcoaceticus	Proteus vulgaris

BIBLIOGRAFIA

- Gonzalez GG, Liprandi F, Ludert JE (2006) Evaluation of a comercial enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigen in fecal samples from children with sporadic acute gastroenteritis. J. Virol. Methods. 136:289-291.
- Schmid M, Oehme R, Schalasta G, Brockmann S, Kimming P, Enders G (2004) Fast detection of noroviruses using a real-time PCR assay and automated simple preparation. BMC Infect Dis. 4:1-8.
- Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis., N Engl. J Med. 2009, 29:1776-85.
- Department of Health and Ageing Norovirus laboratory case definition.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011) Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. MMWR 03;1-15.
- De Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MPG (2006) Diagnosis of norovirus outbreaks by comercial ELISA or RT-PCR J. Virol Methods 137:259-264.
- Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky, AD, Leite JP, et. al. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. J. Clin Virol. 2009,47: 60-4.
- Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, Satou k, MasuokaY, Okitsu S, Maneeakarn N, Nishio O, Ushijima H (2008) Evaluation of immunochromatography and comercial enzyme-linked immunoabsorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. J Virol Methods 147:360-363.
- De Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MPG (2006)Diagnosis of norovirus outbreaks by comercial ELISA or RT-PCR.J. Virol Methods 137:259-264.

IMPORTADOR/ ACONDICIONADOR

MONTEBIO S.R.L.

Vera 575, C.A.B.A., Argentina

Tel. Fax: 4858-0636



Autorizado por ANMAT: PM-246-39

Director Técnico: Farm. Sebastián Antonicelli MN: 14853

Condicion de venta: Uso Profesional Exclusivo.

V-00