

RIDA[®] QUICK Norovirus

N° de art.: N1402



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Alemania
Tel.: +49 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 61 51 81 02-20



1. Área de aplicación

Para el diagnóstico *in vitro*. El test rápido RIDA[®] QUICK Norovirus es un ensayo inmunocromatográfico para la identificación cualitativa de Norovirus del genogrupo 1 (GG I) y genogrupo 2 (GG II) en muestras de heces. Este ensayo sirve como método de detección para el diagnóstico y se utiliza para los exámenes de muestras de heces de niños y adultos cuyos síntomas permiten suponer una gastroenteritis causada por Norovirus.

2. Resumen y explicación del ensayo

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

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

3. Principio del ensayo

El presente ensayo rápido es un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral en el cual se utiliza tanto anticuerpos anti-norovirus biotinilados así como marcados endorado. Apenas haya el norovirus en una muestra positiva, se forman inmunocomplejos con los anticuerpos anti-norovirus marcados, pasando entonces a través de la membrana. La estreptavidina que se encuentra en la línea T de ensayo fija los inmunocomplejos que fluyen hacia ella a través de biotina ligada a los anticuerpos anti-norovirus, produciendo así una coloración rojo-violeta de la línea T. En la siguiente línea de control C quedan fijados los anticuerpos marcados en dorado no complejados que pasen. Consiguientemente, en las muestras negativas no ocurre fijación alguna de inmunocomplejos marcados en dorado en la línea T sino únicamente en la línea C. La línea roja C mostrará siempre si el procedimiento de ensayo fue válido.

4. Contenido del paquete

Los reactivos de un paquete bastan para 25 determinaciones.

Cassette	25 determ.	25 casetes de ensayo empacados individualmente
Reagent A	13,5 ml	Anticuerpo específico anti-norovirus; contiene azida al 0,05%, lista para usar, coloreada en azul
Reagent B	13,5 ml	Anticuerpo específico anti-norovirus; contiene azida al

0,05%, lista para usar, colorada en amarillo

Pipet	25 unidades	Bolsa con 25 pipetas desechables
Reagent vial	25 unidades	Bolsa con 25 tubos de reacción
Pipet Tip	25 unidades	Bolsa con 25 puntas de pipeta
Microlit Pipet	1 unidad	Pipeta para un volumen de 150 µl

5. Reactivos y su almacenamiento

El paquete se puede almacenar a una temperatura de 2 a 25 °C y se podrá utilizar hasta la fecha de vencimiento impresa. Una vez que se ha sobrepasado la fecha de vencimiento ya no se puede asumir garantía sobre la calidad. Asimismo, si el paquete de los casetes estuviese dañado no se podrá garantizar que los casetes estén en buenas condiciones de utilización.

6. Reactivos adicionales necesarios y accesorios requeridos

- Agitador Vortex (opcional)
- Contenedor de residuos con una solución al 0,5% de hipocloruro sódico

7. Medidas de precaución

Únicamente para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo deberá ser llevado a cabo únicamente por personal de laboratorio capacitado. Se deberán respetar las directivas laborales aplicables a los laboratorios clínicos. Se deberán cumplir estrictamente las instrucciones de ejecución del ensayo. Los reactivos contienen azida sódica como agente conservante. Se deberá evitar el contacto con la piel o con las mucosas.

No se deberá pipetear las muestras ni los reactivos con la boca. Se deberá evitar el contacto con heridas en la piel o en las mucosas. Durante el manejo de las muestras se deberá llevar guantes desechables y una vez concluido el ensayo se deberán lavarse las manos. No se deberá fumar, comer ni beber en las áreas donde se trabaje con muestras.

Todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas deberán tratarse como éstas con los desinfectantes apropiados (por ejemplo hipocloruro sódico) o esterilizarse en autoclave durante por lo menos una hora a 121 °C.

8. Recolección y almacenamiento de las muestras

Las muestras de heces se deberán recolectar en contenedores limpios sin ningún tipo de aditivos y almacenarse antes del inicio del ensayo a una temperatura de 2 a 8 °C. Si se prevé almacenar la muestra durante más de tres días, ésta se deberá congelar a - 20 °C. En este caso la muestra se deberá descongelar completamente y llevar a temperatura ambiente antes del inicio del ensayo. Se deberá evitar congelar y descongelar repetidamente la muestra. Si se

prevé utilizar frotis rectales, se deberá prestar atención a disponer de suficiente material de heces (aproximadamente 50 mg) para la ejecución del ensayo.

9. Ejecución del ensayo

9.1. Generalidades

Antes de su utilización, se deberá llevar las muestras, los reactivos así como los casetes de ensayo a la temperatura ambiental (20 a 25 °C). Los casetes de ensayo no se deberán desempacar sino hasta el momento de su utilización. No se deberá volver a utilizar los casetes ya utilizados. Se deberá evitar la radiación solar directa durante la ejecución del ensayo. Los reactivos excedentes no deberán volverse a verter en sus contenedores pues esto podría ocasionar contaminación.

9.2. Preparación del ensayo con muestra

En un tubo de reacción etiquetado **Reagent vial** se gotea respectivamente **0,5 ml** de reactivo A **Reagent A** y reactivo B **Reagent B**. Se deberá tener estrictamente en cuenta la graduación de 0,5 ml y 1,0 ml en el tubo de reacción. Se **deberá** disponer de reactivos A y B en la proporción 1 : 1.

9.2.1 Utilización de muestras de heces

En caso de una muestra de heces **líquida** se suspenderán con la pipeta desechable **Pipet** 50 µl (hasta la segunda graduación) en la mezcla de reactivos preparada.

En caso de muestra de heces **sólida** se suspenderán de modo similar aproximadamente 50 mg. Paso seguido se cerrará bien el tubo de reacción y se homogenizará la muestra mezclándola a fondo (optativamente usando un agitador Vortex). A continuación, la suspensión homogénea deberá sedimentarse **5 minutos**, de modo que se forme un sobrenadante en gran parte libre de partículas. Para la sedimentación insertar el tubo de reacción en uno de los tres agujeros centrales de la pieza de reactivos.

9.3. Ensayo con las muestras

Colocar el casete de ensayo **Cassette** desempacado sobre una superficie plana. Paso seguido, colocar una punta de pipeta **Pipet Tip** no usada en la micropipeta **Microlit Pipet** y sacar 150 µl del sobrenadante del tubo de reacción respectivo y pipetearlo en el campo de aplicación del casete de ensayo. Se deberá cuidar que el líquido pase libremente a través de la membrana. De efectuarse correctamente, después de aproximadamente 3 minutos aparecerá la banda de control en la línea de control C. Si la línea de control no fuese visible después de 3 minutos, será necesario sedimentar más fuertemente una muestra preparada nuevamente (optativamente centrifugando 2000 g durante 2 minutos) y pipetearla en el campo de aplicación de un nuevo casete de ensayo.

El resultado del ensayo se podrá visualizar siempre después de **15 minutos**. La coloración de las bandas puede intensificarse durante todo el tiempo de revelado y después del secado de la tira de rojo violeta a azul hasta gris-violeta.

10. Control de calidad y signos de caducidad del reactivo

El ensayo deberá evaluarse únicamente si el casete de ensayo se encuentra intacto antes del pipeteado de la suspensión de muestra y no muestra modificación de color ni bandas. Asimismo, después de 15 minutos de incubación deberá poder visualizarse la banda de control rojo-violeta. Si esta no apareciera, se deberá verificar lo siguiente antes de repetir el ensayo.

- Durabilidad de los casetes de ensayo y de los reactivos utilizados
- Ejecución correcta del ensayo
- Contaminación de los reactivos

Si después de repetir el ensayo con un nuevo casete de ensayo no se pudiera ver ninguna banda de control, deberá usted ponerse en contacto con el fabricante o con su distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

Como máximo deberán aparecer dos bandas partiendo del campo de aplicación de la muestra en el siguiente orden: Una banda de reacción rojo-violeta en la línea de control C. **Si no apareciera la banda de control, el ensayo no se deberá evaluar y no será válida.**

Se pueden realizar las siguientes interpretaciones:

- **Norovirus positivo:** ambas bandas son visibles.
- **Norovirus negativo:** sólo se puede ver la banda de control.
- **Inválido:** no se puede ver ninguna banda u otra combinación a las descritas anteriormente. Asimismo, la coloración de las bandas que no aparezcan hasta considerablemente después de 15 minutos no tendrán valor de diagnóstico y no deberán evaluarse.

12. Límites del método

RIDA®QUICK Norovirus detecta específicamente norovirus de los grupos GGI y GGII en muestras de heces. No se deberá establecer una relación entre la intensidad de las bandas específicas visibles y la aparición de síntomas clínicos graves. **Los resultados obtenidos deberán interpretarse siempre conjuntamente con el cuadro clínico.**

Un resultado **positivo** no excluye la presencia de otros gérmenes infecciosos u motivos.

Un resultado **negativo** no excluye una posible infección con norovirus. Esto puede deberse a una excreción intermitente del germen infeccioso o a un bajo volumen de norovirus en la

muestra. Si existiese sospecha anamnésica fundada de una infección con el germen infeccioso buscado, se deberá analizar una muestra de heces adicional del paciente.

Un excedente de la muestra de heces puede ocasionar una coloración parduzca de la tira de ensayo que cubra la coloración rojo-violeta de la banda de ensayo específica. En tales casos, será necesario efectuar un nuevo ensayo con una cantidad menor de heces o con una suspensión de heces más clarificada mediante centrifugación, a fin de aclarar si verdaderamente hay norovirus en la muestra pero se hubiese superpuesto la banda de ensayo específica por un exceso de matriz utilizado.

13. Características

13.1 Calidad del ensayo

En un estudio de validación se examinaron un total de 75 muestras de heces (muestras frescas y conservadas en congelador) en el RIDA[®]QUICK Norovirus en comparación con el real time RT-PCR para norovirus de los genogrupos 1 y 2. La tabla siguiente presenta los resultados.

Tabla 1

Sensibilidad y especificidad del RIDA[®]QUICK Norovirus en comparación con real time RT-PCR

		RIDA [®] QUICK Norovirus	
		positivo	negativo
RT-PCR	positivo	23	2
	negativo	1	49

Sensibilidad: 92,0 %

Especificidad: 98,0 %

VPP: 95,8 %

VPN: 96,0 %

13.3 Precisión

A fin de determinar la precisión el ensayo RIDA[®]QUICK Norovirus se examinaron la reproducibilidad intra-ensayo (10 réplicas/ 1 día / 1 operario / 1 lote), la reproducibilidad inter-día (3 réplicas / 10 días / 1 operario / 1 lote), la reproducibilidad inter-operario (3 réplicas / 1 día / 3 operarios / 1 lote) y la reproducibilidad inter-lote (3 réplicas / 1 día / 1 operario / 3 lotes). Para cada examen se midieron 5 referencias: una negativa, dos positivas débiles y dos positivas medianamente fuertes. El ensayo RIDA[®]QUICK Norovirus mostró el resultado esperado en 100% de las mediciones.

13.4 Reactividad cruzada

Se examinaron diferentes gérmenes patógenos del tracto intestinal con el ensayo RIDA[®] QUICK Norovirus, no mostrando ninguna reactividad cruzada. Los exámenes se efectuaron con suspensiones bacterianas (10^7 hasta 10^9 cfu/ml), con cultivos parasitarios (10^7 hasta 10^9 organismos/ml), con sobrenadantes de cultivo celular de células infectadas por virus en una muestra de heces.

La tabla siguiente detalla los resultados.

Tabla 2: Reacciones cruzadas con gérmenes patógenos del tracto intestinal

Germen de ensayo	Procedencia/fuente	Resultado
Adenovirus	Sobrenadante de cultivo celular	negativo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cultivo	negativo
Astrovirus	Sobrenadante de cultivo celular	negativo
<i>Bacillus cereus</i>	Cultivo	negativo
<i>Bacteroides fragilis</i>	Cultivo	negativo
<i>Campylobacter coli</i>	Cultivo	positivo
<i>Campylobacter fetus</i>	Cultivo	negativo
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultivo	positivo
<i>Campylobacter lari</i>	Cultivo	negativo
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	Cultivo	negativo
<i>Candida albicans</i>	Cultivo	negativo
<i>Citrobacter freundii</i>	Cultivo	negativo
<i>Clostridium difficile</i>	Cultivo	negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	Cultivo	negativo
<i>Clostridium sordellii</i>	Cultivo	negativo
<i>Cryptosporidium muris</i>	Cultivo	negativo
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cultivo	negativo
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Cultivo	negativo
<i>E. coli</i> (O6)	Cultivo	negativo
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Cultivo	negativo
<i>Enterobacter cloace</i>	Cultivo	negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultivo	negativo
Muestra de giardia lamblia	Muestra de heces	negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultivo	negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultivo	negativo

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultivo	negativo
Rotavirus	Sobrenadante de cultivo celular	negativo
<i>Salmonella enteritidis</i>	Cultivo	negativo
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cultivo	negativo
<i>Serratia liquefaciens</i>	Cultivo	negativo
<i>Shigella flexneri</i>	Cultivo	negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultivo	negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultivo	negativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cultivo	negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cultivo	negativo

14. Sustancias de interferencia

Las sustancias mencionadas a continuación no mostraron ningún efecto sobre los resultados del ensayo al mezclarse en las concentraciones especificadas con las muestras de heces positivas y negativas de norovirus:

Sulfato de bario (5 % m/m), loperamida (antidiarréico; 5 % m/m), Pepto-Bismol (antidiarréico; 5 % v/m), mucina (5 % m/m), ciclamato (edulcorante artificial 5 % v/m), sangre humana (5 % v/m), ácido esteárico / ácido palmítico (mezcla 1:1, 40 % m/m), metronidazol 0.5 (antibiótico 5 % v/m), diclofenaco (0.00263 % v/m).

Literatura

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