

RIDA[®] QUICK Norovirus

Art. n°.: N 1403



R-Biopharm AG, Landwehrstr. D-64293 Darmstadt, Germany
Tel: +49 (0) 6151- 8102 - 0 / Fax: +49 (0) 6151- 8102 - 20



1. Uso previsto:

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. Explicación

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. Fundamento del test

El presente test rápido es un ensayo inmunocromatográfico de membrana en varios pasos en el cual se emplean anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra el Norovirus. El casete de análisis posee, junto a la ventana de la muestra, una ventana de reacción dentro de la cual existen dos líneas horizontales donde están absorbidos los anticuerpos inmovilizados. La línea del test (T) contiene anticuerpos contra el antígeno del Norovirus. La línea de control C contiene anticuerpos IgG anti-ratón. El conjugado 1 contiene anticuerpos biotinilados contra los antígenos del Norovirus y el conjugado 2 consiste en peroxidasa de rábano picante unida a estreptavidina. Para la ejecución del test se mezclan cantidades definidas del conjugado 1 y el sobrenadante de la suspensión de la muestra preparada anteriormente y se transfieren con una pipeta a la segunda ventana más pequeña del casete (ventana de la muestra). Durante los 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se produce la migración de la mezcla muestra-conjugado desde la almohadilla del filtro que absorbe la muestra a la membrana de análisis. En este proceso se lleva a cabo la unión del complejo antígeno-conjugado de las muestras positivas con los anticuerpos inmovilizados contra el Norovirus en la línea del test y por su parte los anticuerpos biotinilados libres de antígeno se enlazan en la línea de control. Tras la adición del conjugado 2 y un tiempo de incubación de 1 minuto a temperatura ambiente se efectúa la unión

del complejo estreptavidina-peroxidasa con la biotina inmovilizada por los anticuerpos específicos.










A continuación se elimina de la ventana de reacción el conjugado de peroxidasa no enlazado utilizando buffer de lavado. Cuando se adiciona entonces el sustrato, ocurre la formación de una línea azul al cabo de 3 minutos en la línea de análisis (T), en caso de existir una muestra positiva al Norovirus y también una línea azul en la línea de control (C). Si la coloración azul en la línea de control no aparece, esto pone de manifiesto un desarrollo incorrecto del test y se considera como un resultado no evaluable.

4. Materiales contenidos en el envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 20 determinaciones

| | | |
|----------------------|------------|---|
| Cassette | 20 determ. | 20 Casetes de ensayo envasados individualmente |
| Diluent | 30 ml | Buffer de dilución de muestras, solución de NaCl tamponada con buffer de proteína; contiene Kathon CG al 0,05%; listo para el uso; teñido de azul |
| Wash | 10 ml | Buffer de lavado, solución de NaCl tamponada con buffer de fosfato; listo para el uso |
| Conjugate 1 | 7 ml | Anticuerpos conjugados con biotina contra Norovirus en solución estabilizada de proteína; listo para el uso; teñido de azul |
| Conjugate 2 | 5 ml | Conjugado estreptavidina-peroxidasa en solución estabilizada de proteína; listo para el uso |
| Substrate | 7 ml | Peróxido de hidrógeno / TMB; listo para el uso |
| Pipet | 25 piezas | Bolsa con 25 pipetas desechables |

Explicación de los símbolos

| | | | |
|---|--|--|----------------------|
|  IVD | Diagnóstico in-vitro |  REF | Número de producto |
|  i | Cumplir con las instrucciones para el uso* |  | Cantidad de tests |
|  LOT | Número del lote |  | Fecha de fabricación |
|  | Fecha de caducidad |  | Fabricante |
|  | Temperatura de almacenamiento | | |

5. Materiales necesarios no contenidos en el envase

- Tubos de ensayo pequeños para las suspensiones de heces (por ej. Tubos Eppendorf) con gradilla
- Agitador Vortex
- Guantes desechables
- Cronómetro
- Recipiente de desechos con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%
- Asa de siembra o espátula desechables para la toma de la muestra

6. Medidas de seguridad

1. Sólo para el diagnóstico *in vitro*.
2. Este test debe ser realizado solamente por personal calificado de laboratorio. Se deben observar las líneas directivas de trabajo para laboratorios médicos.
3. Las instrucciones para el uso del test deben cumplirse estrictamente.
4. El buffer de dilución de muestras contiene Kathon CG. Se debe evitar, por tanto, el contacto con la piel o mucosas.
5. No pipetear las muestras o los reactivos con la boca.
6. Evitar el contacto con la piel lesionada o las mucosas.
7. Durante el trabajo con las muestras deben usarse guantes desechables y lavar las manos después del test.
8. En los locales donde se trabaje con las muestras no está permitido fumar, comer o beber.
9. Es necesario que todos los materiales y reactivos que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas se sometan a un tratamiento con agentes desinfectantes adecuados (por ej. hipoclorito de sodio) o se esterilicen en autoclave por lo menos durante una hora a 121 °C.
10. Los reactivos en el Kit RIDA®QUICK Norovirus no se deben usar posterior a la fecha de caducidad. Todos los reactivos están preparados para que desarrollen un funcionamiento óptimo. La dilución o modificación de estos reactivos conduce al deterioro de sus funciones. Del mismo modo se pueden producir resultados erróneos si no se cumplen los espacios de tiempos previstos y las temperaturas para la ejecución del test.
11. Los reactivos de distintos lotes del Kit RIDA®QUICK Norovirus no se deben mezclar ni utilizar en el análisis.
12. Se debe evitar la contaminación microbiana de los reactivos y muestras ya que pueden conducir a resultados erróneos.
13. Para cada muestra se debe usar una pipeta diferente a fin de evitar la contaminación cruzada que también conduce a resultados erróneos.
14. Los casetes que se hayan usado una vez no se deben volver a utilizar.

7. Durabilidad y almacenamiento

Es indispensable conservar los reactivos entre 2–8 °C y se pueden usar hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad no se asumen garantías de calidad. Del mismo modo tampoco se puede garantizar la capacidad de uso de casetes cuyo envase exterior individual esté tan dañado que pueda penetrar la humedad.

8. Indicios de inestabilidad o deterioro de los reactivos

El test sólo debe evaluarse si el casete de ensayo está intacto **antes** de proceder a pipetear la suspensión de la muestra en la ventana, y a excepción de una coloración rojiza leve en el lado C, no se aprecian en las ventanas cambios en el color o bandas. Además, es imprescindible que se observe, **después** de la etapa de incubación del test, por lo menos la banda **azul** de control (C). Si ésta no aparece, se deben hacer las siguientes comprobaciones antes de repetir el test:

- Fecha de caducidad de los casetes de ensayo y del buffer de dilución de muestras utilizado
- Ejecución correcta del test
- Contaminación del buffer de extracción

Si entonces en la repetición del test con un nuevo casete tampoco es visible la banda de control, usted se debe dirigir al fabricante o a su distribuidor local de R-Biopharm.

9. Recolección y conservación de las muestras

Las muestras de heces se deben coleccionar en recipientes limpios sin ningún tipo de aditivo y conservar entre 2 – 8 °C antes del comienzo del test. La recolección debe realizarse lo antes posible después de la manifestación de los síntomas (diarrea, vómitos), debido a que la mayor excreción de virus se produce en el periodo de 1 - 3 días después de la aparición de los primeros síntomas. Si se conserva por más 3 días, la muestra se debe guardar congelada a -20 °C. Las muestras guardadas en frío se deben descongelar completamente antes de iniciar el test y adaptar a la temperatura ambiente e igualmente es preciso, como se hace con las muestras frescas, efectuar un buen mezclado de las mismas antes de su uso. Evite congelar y descongelar las muestras varias veces.

Si se van a utilizar frotis rectales se debe prestar atención a que haya suficiente material de heces (aprox. 100 mg) para la realización del test.

10. Preparación de las muestras y los reactivos

Las muestras, el buffer de dilución y los casetes de ensayo deben adaptarse a la temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de proceder a utilizarlos. Los casetes de ensayo sólo deben abrirse

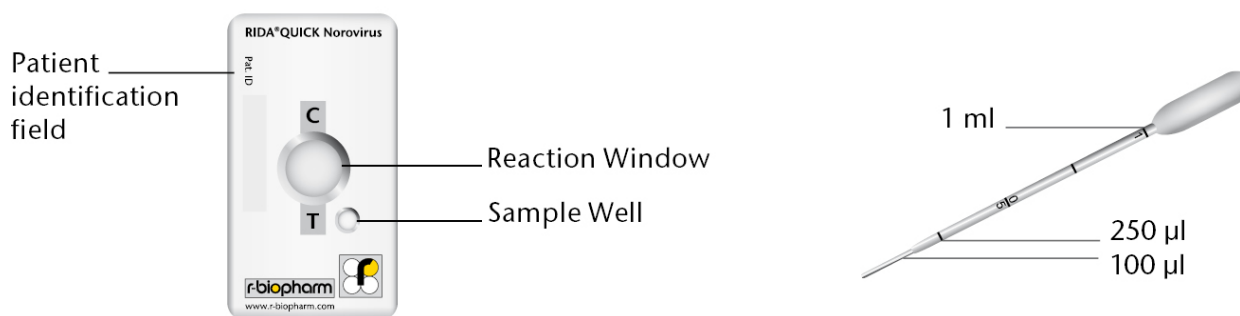
rasgando la envoltura exterior poco antes de su uso. Los casetes extraídos de su envoltura o que se hayan usado una vez no se deben volver a utilizar. Se debe evitar la incidencia directa de la luz solar durante la realización del test.

10.1. Preparación de la suspensión de la muestra

En un tubo de ensayo rotulado se vierte 1 ml de buffer de dilución de muestras **Diluent**. En el caso de una muestra **líquida** de heces se aspiran con una pipeta desechable **Pipet** 100 μ l (tomando un poco por encima del segundo espesamiento) y se hace una suspensión en el tubo de ensayo con el buffer de dilución. En el caso de muestras **sólidas** de heces se toman 50 – 100 mg (volumen de un guisante pequeño) y se suspenden en el buffer. Acto seguido se debe homogeneizar bien la muestra. Esto se efectúa mediante la aspiración y expulsión repetida de la suspensión con la pipeta desechable **Pipet** o alternativamente por agitación en un mezclador Vortex. Se deja reposar la suspensión homogénea al menos durante **2 minutos** para que pueda sedimentar.

11. Realización del test

Fig. 1: Imágenes del casete de ensayo y la pipeta desechable



1. Extraer el casete de ensayo **Cassette** de su envoltura exterior y colocar sobre una superficie plana.
2. Aspirar con la pipeta desechable ya usada para esta muestra 250 μ l del sobrenadante de la suspensión preparada (primera marca) y transferir a un tubo de ensayo limpio y rotulado.
3. Adicionar 6 gotas (sostener el frasco en posición vertical) de conjugado 1 **Conjugate 1**
4. Mezclar la muestra a fondo y aspirar todo el volumen con la pipeta desechable **Pipet** y verterla, despacio pero en un flujo constante, en el casete en su ventana de la

muestra. Se sostiene la pipeta en posición inclinada en un ángulo aprox. de 45° con la punta en dirección a la ventana de reacción para que toda la mezcla llegue a la membrana de esta ventana (Fig. 2).

Fig. 2: Dirección de la pipeta con la muestra con respecto al casete



5. Se incuba el casete durante **10 minutos** a temperatura ambiente (20 -25 °C). Se debe prestar atención a que la membrana se humedezca a fondo con la muestra. En caso contrario es necesario pipetear adicionalmente otros 100 µl de **Diluent** en la ventana de la muestra.
6. Agregar 4 gotas (sostener el frasco en posición vertical) de conjugado 2 **Conjugate | 2** en la ventana de reacción e incubar el casete durante 1 minuto a temperatura ambiente.
7. Se adicionan ahora 10 gotas de buffer de lavado **Wash** en la ventana de reacción y se espera hasta que se haya absorbido todo el buffer.
8. Se añaden 6 gotas de sustrato (sostener el frasco en posición vertical) **Substrate** en la ventana de reacción.
9. Se puede leer el resultado en el curso de los siguientes 3 minutos. Las coloraciones o bandas que aparecen después de transcurridos 3 minutos se deben evaluar como carentes de valor diagnóstico.

12. Interpretación de los resultados

1. La mayor fiabilidad en la evaluación de los análisis se alcanza si se leen los resultados en el transcurso de los primeros 3 minutos posteriores a la adición del sustrato, con buena iluminación y ante la presencia de una línea perfectamente visible.
2. Se recomienda verificar si en el lado “C” de la ventana de reacción aparece una línea azul, denominada línea interna de control, y que en el lado “T” igualmente sea visible una línea azul, llamada la línea del test.

La intensidad del color de las líneas puede variar entre tenue y más oscuras.

3. **Resultado positivo:** Se reconoce si el resultado es positivo, cuando en el lapso de 3 minutos posteriores a la adición de sustrato, aparecen las dos líneas azules (la línea “T” del test

y la línea "C" de control. La intensidad de la coloración puede ir de tenue a oscura, sin embargo, también una sola línea nítida puede ser evaluada como un resultado positivo. Si aparecen otras coloraciones de la membrana o sombras, éstas **no** deben evaluarse como resultado positivo.

4. **Resultado negativo:** Solamente después de transcurridos 3 minutos se debe interpretar el test como negativo o no válido. Aparece solamente la línea azul en el lado de control "C" de la ventana de reacción, pero no existe la línea azul en el lado "T" de la ventana de reacción. Un resultado negativo significa o bien la ausencia de antígenos del Norovirus en la muestra o que la cantidad de antígeno es tan reducida que se encuentra por debajo del límite de detección del test.

5. **Resultado no válido:** No aparece ni en el lado "T" del test ni en el lado "C" de control de la ventana de reacción ninguna línea o únicamente una línea en el lado "T". En ambos casos se debe considerar el análisis como no válido y repetir el test con un nuevo casete. En la figura 3 se presentan las distintas posibilidades de interpretación de las líneas.

Fig. 3: Posibilidades de interpretación de los resultados del test RIDA®QUICK Norovirus



13. Control de calidad

Como máximo deben aparecer solamente dos bandas azules. **¡Si no aparece la banda azul de control (C) el test no es evaluable y por tanto inválido!** La banda azul de control confirma que la muestra y los reactivos han sido adicionados correctamente y los reactivos en el curso del test poseen actividad, así como también se ha producido la migración correcta de la muestra a través de la membrana. Un fondo transparente en el área de los resultados (ventana de reacción) se considera como control negativo interno. Si el test se ejecuta correctamente y los

reactivos funcionan bien el fondo debe ser transparente para que se puedan reconocer los resultados.

14. Límites del método

El test RIDA[®]QUICK Norovirus sirve para la identificación de los Norovirus del genogrupo I y II detectando su presencia en muestras de heces, siempre y cuando la carga viral no sea insuficiente y se encuentre por debajo del límite de detección del ensayo. Para el análisis es decisivo que la muestra de heces del paciente que padece la gastroenteritis se obtenga durante la fase sintomática de la enfermedad. La intensidad de la coloración azul de la banda del test no permite hacer conclusiones acerca de la magnitud de los síntomas clínicos, sino que constituye únicamente un indicador de la cantidad de antígenos del virus presentes en la muestra. Su color puede variar desde un azul muy tenue hasta un tono azul muy oscuro.

Un resultado positivo no excluye la presencia de otros agentes patógenos. Del mismo modo, es posible la presencia simultánea de dos o varios agentes patógenos en la muestra y sólo puede esclarecerse mediante un diagnóstico diferencial. En los casos de infecciones dobles o triples los síntomas pueden ser más fuertes que cuando la causa es un solo patógeno.

Un resultado negativo no excluye necesariamente la presencia de Norovirus y que éstos sean los causantes de una gastroenteritis. Los motivos para esta situación pueden ser una excreción intermitente del virus, una carga viral muy baja en las heces, mala selección del momento de muestreo o el transporte inadecuado y condiciones incorrectas de conservación de la muestra. Si existe la sospecha fundada de una infección por Norovirus, es preciso realizar un test con otra muestra.

15. Valores esperados

Los Norovirus son considerados entretanto en el 70 % de los casos como la causa más frecuente de los brotes epidémicos de gastroenteritis no bacteriana en el mundo, así como en aprox. el 50 % de los casos de enteritis aguda. Además de su amplia incidencia en instituciones sociales son también la causa frecuente de enfermedades diarreicas de manifestación esporádica. Después de los Rotavirus son la causa más frecuente de gastroenteritis en la edad infantil, pero no excluyen a los adultos de su ataque. Debido a la variabilidad genética de los Norovirus las personas que se infectan por primera vez no desarrollan una inmunidad permanente, de modo que las infecciones recurrentes no constituyen un fenómeno raro.

En consonancia con este hecho, los resultados positivos varían dependiendo de la prevalencia de los Norovirus en una determinada población y del genotipo circulante, así como del entorno de los pacientes. Además, otros factores como la obtención de la muestra, su transporte y conservación, influyen en los índices de resultados positivos.

16. Datos acerca del rendimiento

En un estudio de validación se evaluó el test RIDA[®]QUICK Norovirus en un total de 113 muestras de heces. Las muestras procedían de pacientes enfermos de gastroenteritis por brotes esporádicos o epidémicos, se recolectaron en la temporada de invierno 2007/2008 en la región de Hamburgo y se analizaron frescas mediante la técnica RT-PCR en el Instituto de Higiene local y posteriormente se conservaron congeladas en dicho centro. En julio 2008 se procedió a descongelar estas muestras y analizarlas en el propio Instituto con el test RIDA[®]QUICK Norovirus para llevar a cabo una comparación con el método de ensayo RIDASCREEN[®] Norovirus ELISA disponible comercialmente. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Correlación del test rápido RIDA[®]QUICK Norovirus con el RT-PCR y el RIDASCREEN[®] Norovirus ELISA

| | | RIDA [®] QUICK | | RIDASCREEN [®] | |
|----------|---|-------------------------------|----|-------------------------------|----|
| | | Evaluación de muestras 2007/8 | | Evaluación de muestras 2007/8 | |
| | | + | - | + | - |
| RT - PCR | + | 49 | 8 | 43 | 13 |
| | - | 3 | 53 | 1 | 55 |

| | | |
|----------------------------|--------|--------|
| Sensibilidad: | 86,0 % | 76,8 % |
| Especificidad: | 94,6 % | 98,2 % |
| Valor predictivo positivo: | 94,2 % | 97,7 % |
| Valor predictivo negativo: | 86,9 % | 80,9 % |
| Exactitud: | 90,3 % | 87,5 % |

16.1 Reproducibilidad

Tres laboratorios independientes evaluaron cada uno 5 muestras de heces en un análisis por cuadruplicado en dos momentos diferentes de un día (variabilidad intra-ensayo), así como en tres días diferentes (variabilidad inter-ensayo). Las muestras se componían de 2 negativas, 2 débil-positivas y una moderadamente positiva.

El test RIDA[®]QUICK Norovirus demostró un 100% de reproducibilidad incluyendo la presencia de la línea de control.

16.2 Reactividad cruzada

Diferentes gérmenes patógenos del tracto intestinal fueron analizados con el test RIDA®QUICK Norovirus y no presentaron reactividad cruzada. Los exámenes fueron realizados en suspensiones no diluidas de bacterias con una concentración de 10^6 hasta 10^9 microorganismos por ml. Los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Evaluación de la reactividad cruzada entre diferentes microorganismos

| Germen de prueba | Origen | Denominación | Resultado |
|-----------------------------|---------------|---------------------|------------------|
| Citrobacter freundii | | DSM 30047 | negativo |
| Enterobacter cloacae | | DSM 30054 | negativo |
| Enterococcus faecalis | | DSM 2570 | negativo |
| Enterococcus faecium | | DSM 20477 | negativo |
| E. coli | aislamiento | | negativo |
| E. coli | aislamiento | | negativo |
| E. coli | aislamiento | | negativo |
| E. hermannii | | DSM 4560 | negativo |
| Lactococcus lactis | | DSM 20481 | negativo |
| Listeria innocua | | DSM 20649 | negativo |
| Proteus mirabilis | | DSM 788 | negativo |
| Proteus mirabilis | | DSM 4479 | negativo |
| Proteus vulgaris | | DSM 30119 | negativo |
| Providencia stuartii | | | negativo |
| Pseudomonas auruginosa | | DSM 939 | negativo |
| Salmonella Agona | aislamiento | | negativo |
| Salmonella Choleraesuis | | DSM 4224 | negativo |
| Salmonella Infantis | aislamiento | | negativo |
| Salmonella Ohio | aislamiento | | negativo |
| Salmonella Typhimurium | aislamiento | DSM 554 | negativo |
| Staphylococcus aureus | | DSM 20372 | negativo |
| Streptococcus agalactiae | aislamiento | DSM 2134 | negativo |
| Streptococcus dysgalactiae | aislamiento | DSM 20662 | negativo |
| Escherichia coli (O157:H-) | aislamiento | | negativo |
| Escherichia coli (O116:H21) | aislamiento | | negativo |
| Escherichia coli (O111:H-) | aislamiento | | negativo |
| Escherichia coli (O22:H8) | aislamiento | | negativo |
| Escherichia coli (O26:H11) | aislamiento | | negativo |
| Candida albicans | | ATCC 10231 | negativo |
| Salmonella enteritidis | | DSM 9898 | negativo |
| Morganella morganii | | DSM 6675 | negativo |
| Shigella boydii | | DSMZ 7532 | negativo |
| Listeria grayi | | DSMZ 20596 | negativo |
| Listeria denifrificans | | DSMZ 20603 | negativo |

| | | | |
|-----------------------------------|--|------------|----------|
| Listeria grayi | | DSMZ 20601 | negativo |
| Listeria seelgeri | | DSMZ 20751 | negativo |
| Listeria welshimera | | DSMZ 20650 | negativo |
| Listeria ivanovii subsp. Ivanovii | | DSMZ 20750 | negativo |
| Listeria monocytogenes SG 1/2a | | DSMZ 20600 | negativo |
| Listeria monocytogenes SG 1 | | ATCC 19111 | negativo |
| Listeria monocytogenes SG 4b | | ATCC 19115 | negativo |
| Enterobacter sakasaki | | | negativo |

16.3 Sustancias que causan interferencia

Las siguientes sustancias no mostraron ningún efecto en los resultados del test cuando fueron añadidas a las muestras de heces en las concentraciones indicadas: Sulfato de bario (5% p/p), Loperamida (Immodium 5% p/p), Peptobismol (5% v/p), mucina (5% p/p), edulcorante (5% v/p), sangre humana (5% v/p), ácido esteárico/palmitico (mezcla 1:1, 40% p/p), solución inyectable de metronidazol (0,5) (5% v/p), diclofenaco (0,00263% v/p).

17. Bibliografía

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 of 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