

SIMPLE ROTA-ADENO-NORO

POUZE PRO ODBORNÉ POUŽITÍ

PŘED POUŽITÍM TESTU PŘEČTĚTE POZORNĚ TENTO PRACOVNÍ NÁVOD.

ÚVOD

- Použití

Jednostupňový imunochromatografický test pro pomoc při diagnostice gastrointestinální infekce způsobené Rotavirem, Adenovirem a Norovirem, pomocí kvalitativní detekce antigenů rotaviru, adenoviru a noroviru genoskupiny I (GI) a genoskupiny II (GII) v lidské stolici na samostatných proužcích.

Pozitivní signál v kterékoliv linii testu by měl přitáhnout pozornost klinika na možnost rotavirové, adenovirové a/nebo norovirové infekce a přispět k diagnóze pacienta.

V případě negativního výsledku u pacienta s typickou symptomatologií těchto typů infekcí se doporučuje potvrdit výsledek pomocí jiné metody.

Výsledky získané pomocí Simple Rota-Adeno-Noro by měl vyhodnotit lékař v kombinaci s dalšími dostupnými klinickými informacemi od pacienta. Neměly by být použity jako jediné kritérium pro stanovení diagnózy infekce.

Test je kvalitativní a jeho provádění není automatizované, i když interpretaci výsledků lze provést vizuálně nebo pomocí čtečky proužků.

Tento test je určen výhradně pro diagnostické použití in vitro.

Tento test je určen pro odborné použití. Tento diagnostický test nenahrazuje lékařskou péči o pacienta. Tento test neslouží k sebetestování.

- Obecné informace

Simple Rota-Adeno-Noro umožňuje diferenciální detekci rotaviru a adenoviru na jednom stripu a noroviru GI a noroviru GII na jiném stripu.

Test je založen na imunologickém záchytu barevných mikročástic při jejich průchodu membránou, na které jsou navázány specifické monoklonální protilátky proti Rotaviru, Adenoviru a Noroviru GI a GII imobilizované ve čtyřech jednotkových liniích.

- Testovaná populace

I když jakákoliv skupina populace může být ovlivněna kterýmkoli ze tří virů detekovaných jednoduchým Rota-Adeno-Noro testem, značný počet vzorků bude pocházet od dětí, protože jsou nejvíce náchylné k rozvoji příznaků,

kteří by mohly ohrozit zdraví pacienta. V případě noroviru je také obvykle spojen s propuknutím otravy jídlem (velmi běžní jsou nedostatečně tepelně upravení měkkýši/zpracovaní jako ústřice a slávky), proto je tento test určen pro použití u ohnisek této etiologie (velmi časté např. na okružních plavbách).

- Výskyt onemocnění v populaci

Mnoho publikací poukazuje na tyto tři viry jako na hlavní zdroje virových gastrointestinálních infekcí na celém světě. U dětí ve věku 0 až 28 měsíců je odhadovaná prevalence gastrointestinálního viru 21 % pro Rotavir, 13 % pro Norovirus a 5 % pro Adenovirus¹¹. Dále existují důkazy o nejčastější koinfekci vyskytující se mezi rotaviry a noroviry, s frekvencí 50 %, následované rotaviry a adenoviry kolem 16 %; a dokonce 6 % případů musí být detekováno pro vícenásobnou infekci všemi třemi viry.

- Charakteristika rotavirů a jejich infekcí^{1,2,3}

Rotaviry jsou dvoušroubovicové RNA viry patřící do rodiny Reoviridae. Jsou to viry s nízkou infekční dávkou a jejich přenos probíhá přímým kontaktem z člověka na člověka fekálně – orální cestou a méně často přenosem kontaminovanou vodou a potravinami. Rotavirus je jedním z hlavních etiologických agens akutní gastroenteritidy v celém světě a hlavním kauzálním agens závažných případů dehydratace u dětí mezi 6 měsíci a 2 lety, hlavně v rozvojových zemích, kde je příčinou vysoké mortality, stejně jako v zemích s vysokou životní úrovní. Velké množství dětí ve věku 5 let (>95%) už prodělalo alespoň jednu příhodu gastroenteritidy způsobené rotavirem. Ačkoliv je jejich incidence redukována díky vývoji vakcín, pouze některé země zařadily jejich implementaci do národních vakcinačních programů.

Rotavirus je rozdělen do sedmi antigenních sérotypů (A až G). Pouze typy A, B a C infikují člověka, s tím, že typ A je původcem téměř všech případů.

- Charakteristika adenovirů a jejich infekcí¹

Adenovirus je na třetím místě v příčinách virových gastroenteritid u dětí (10-15%); může také způsobit respirační onemocnění v závislosti na sérotypu, průjmami, konjunktivitou, cystitidou a jinými. Bylo identifikováno více než 47 sérotypů adenoviru a u všech je přítomen hexon antigen. Sérotypy 40 a 41 jsou spojeny s gastroenteritidami. Hlavním klinickým symptomem gastroenteritida způsobená adenovirem je průjem 9 až 12 dní často spojený s horečkou a zvracením.

- Charakteristika norovirů a jejich infekcí

Norovirus je jedno-vláknový, pozitivně směřovaný RNA virus patřící do rodiny *Caliciviridae*^{4,5,6}. Je vysoce nakažlivý a jeho hlavní cesta přenosu je kontakt mezi lidmi a kontaminovanými potravinami / vodou. Obvykle virus způsobuje velké epidemie v uzavřených komunitách (nemocnice, domovy důchodců, školy, školky, jesle,

restaurace, výletní lodě apod.). Pokud se někde objeví infekce propuká velice záhy.

Různé studie demonstrují, že norovirus je hlavní příčinou virové gastroenteritidy v jakémkoliv věku kdekoli na světě a je příčinou téměř 50 % epidemií gastroenteritid⁶. Rozlišujeme 5 genových skupin norovirů (GI až GV) a uvnitř každé skupiny je virus ještě rozdělen do genotypů. Nejvíce klinických případů mají na svědomí kmeny skupiny genotypů I a II náležející ke genotypům GI.1 a GI.4, které jsou nejběžnější^{7,8}. obecně infekce GI jsou méně časté než infekce GI^{9,10}.

ZÁKLADNÍ PRINCIPY TESTU

Rota-Adeno-Noro test obsahuje dva stripy umístěné ve dvojité kazetce:

1. Rota-Adeno strip využívá kombinace:

a. Modré latexové částice konjugované specifickými protilátkami proti hexon antigenu adenoviru, který reaguje protilátkami specifickými pro adenovirus lokalizovanými na membráně pod linií pro rotavirus.

b. Červené latexové částice konjugované specifickými protilátkami proti antigenu rotaviru skupiny A VP6, který reaguje s specifickou protilátkou Rotaviru lokalizovaných na membráně pod kontrolní linií.

c. Zelené latexové částice konjugované antigenem, rozpoznávaným specifickými protilátkami pro řečený antigen, navázaný na membráně, který slouží jako takzvaná kontrolní linie pro test.

2. Norovirus strip využívá kombinaci:

a. Červených latexových částic konjugovaných specifickými protilátkami proti GI které reagují se specifickými protilátkami GI lokalizovanými na membráně pod linií GI.

b. Červených latexových částic konjugovaných specifickými protilátkami proti GI které reagují se specifickými protilátkami pro GI lokalizovanými na membráně pod kontrolní linií.

c. Zelených latexových částic, konjugovaných k antigenu, rozeznávanému specifickými protilátkami pro tento antigen vázaných na membráně tvořící tzv. kontrolní linii.

V tomto výrobku je nejdříve vzorek ošetřen dilučním pufrům (obsaženým v soupravě), aby došlo k extrakci viru z fekální matrice. Po extrakci se přidá specifické množství supernatantu k oběma reaktivním stripům a čeká se 15 minut.

Poté co extrahovaný vzorek prochází membránou na obou stripech migrují barevné částice. V případě, že je vzorek pozitivní, specifické protilátky navázané na membráně zachytí barevné částice.

Objeví se různé barevné linie podle přítomnosti viru ve vzorku. Tyto linie se odečítají a interpretují po 15 minutách inkubace při pokojové teplotě (viz. Obr. 1 a 2).

TEST FORMATS

Test Simple Rota-Adeno-Noro je k dispozici ve formátu Simple. V tomto formátu jsou dva reaktivní proužky uvnitř dvojitého pouzdra. Extrahované vzorky se přidávají přímo do okének pro vzorky označených šipkou na krytu.

Tento návod k použití je určen pro všechny komerční soupravy s katalogovým číslem 9.050.XXX.YY.ZZZ

MATERIÁL, KTERÝ JE SOUČÁSTÍ SOUPRAVY

- Reakční pomůcky: dva reakční stripy jsou umístěny ve dvojité plastové kazetce.
- Lahvičky s dilučním pufrům vzorků: počet lahviček odpovídá počtu dodávaných kazetek. .
- Nekalibrované jednorázové plastové pipety.
- Návod k použití (úplný a/nebo zkrácený).
- Datamatrix

Bezpečnostní list výrobku obsahuje informace o složení činidel. Elektronickou kopii listu si můžete vyžádat e-mailem na adrese msds@operon.es

MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY

Vortex

Stopky

Uživatel má k dispozici kontroly pro ověření výsledků, které lze získat jako nezávislou komerční referenci.

VYBAVENÍ PRO INTERPRETACI VÝSLEDKŮ

Test je možné odečítat vizuálně nebo pomocí přístroje OPERON Lateral Flow Reader.

U této diagnózy je prokázána 99% shoda mezi vizuální interpretací a čtečkou OPERON IC strip pro Adenovirus a Norovirus, av případě Rotaviru odpovídá hodnotě 98% a vyšší.

OPERON Lateral Flow Reader

 IUL, S.A.

Carrer de la Ciutat d'Asunción, 4
08030 Barcelona, SPAIN

Obchodní reference 9.901.001.90.000

UPOZORNĚNÍ

1. Se vzorky pacientů (stolice) je třeba nakládat jako s potenciálně infekčním materiálem. Je třeba používat jednorázové ochranné rukavice během celého pracovního postupu

2. Diluent vzorku obsahuje azid sodný 0,095% jako antimikrobiální agens. Zabraňte přímému kontaktu s kůží a sliznicemi. Likvidujte odpovídajícím způsobem.

V případě že pufr jeví znaky kontaminace nebo precipitace, nepoužívejte jej.

Pufry pro ředění vzorků obsahují materiál živočišného původu (albuminy). Všechny materiály živočišného původu jsou komerční referencí a mají certifikát, který

dokazuje, že nejsou infekční.

3. V místě, kde se zpracovávají vzorky neskladujte a nepřipravujte jídlo, pití ani nekuřte.

4. Po ukončení práce očistěte pracovní plochu mýdlem a vodou a dezinfikujte. Nakonec zlikvidujte rukavice a důkladně omyjte ruce vodou a mýdlem.

5. Nezaměňujte reagenty ze souprav s různými šaržemi.

6. Pokud je souprava skladována v chladu, nechte před prací reagenty a vzorek stolice vytemperovat na pokojovou teplotu, protože chladné reagenty mohou snížit funkci a citlivost testu. Většinou stačí 20-30 minut pro dosažení pokojové teploty.

7. Používejte reagenty pouze in vitro.

8. Imunochromatografické testy jsou určeny pro jedno použití. Reakční prostředek se používá pro vyšetření jednoho vzorku.

9. Nepoužívejte složky soupravy po expiraci.

10. V případě, že dojde k porušení vnějšího obalu, je možné soupravu použít pokud nejsou poškozeny vnitřní komponenty.

11. V případě, že dojde k poškození primárního obalu, zlikvidujte test.

12. Výrobek vyjměte z hliníkového obalu těsně před použitím testu, aby se zabránilo nadměrnému vystavení produktu vnějším vlivům.

13. Je velice důležité přidat správný objem extrahovaného vzorku do aplikační zóny označené šipkou na plastové kazetce. Pokud je objem menší, než je požadováno, může se stát, že vzorek se nedostane až k reakční zóně, a tak nedojde ke chromatografické reakci; V případě, že je objem větší, nadbytečný objem se by se mohl přelít uvnitř kazetky a chromatografie by se nemusela vyvíjet správně.

14. Jakmile je strip použit, je vhodné manipulovat s ním jako se vzorkem se stripy a tudíž s náležitou opatrností jako s biologicky nebezpečným materiálem.

15. Použitý výrobek by měl být zlikvidován v souladu s platnou legislativou.

16. Nepoužívejte výrobek, pokud se objeví barevné linie před začátkem testu.

17. Je důležité aplikovat správné množství vzorku: přibližně 110 mg pevného vzorku (malá porce o průměru 5 mm). Pokud je polotuhého vzorku, ale není možné jej vzít pipetou) vezměte množství pokrývající drážky na tyčince připojené k víčku lahvičky. Nebo přidejte 110 µl pokud je vzorek tekutý (4 kapky pomocí jednorázové pipetky dodávané v soupravě). Toto množství extrahujte v dilučním pufru vzorku v lahvičkách v soupravě. Relativní přebytek vzorku oproti požadovanému může zabránit správnému průběhu imunochromatografické reakce. To je obzvláště kritické u pevných vzorků, protože není snadné správně odhadnout doporučené množství vzorku.

Vzorek se stane vadným, když se k němu přidá nesprávné množství pufru. Tato nepřesnost může ovlivnit výsledek testu a je zvláště kritická pro vzorky s nízkou koncentrací analytu.

18. Nelikvidujte obal soupravy, pokud ještě nejsou použity všechny testy. Na krabici jsou uvedeny důležité informace o CE značce výrobku a číslo šarže.

19. Jakýkoli závažný incident týkající se výrobku musí být nahlášen výrobcem a příslušnému orgánu v členském státě, kde se uživatel a/nebo pacient nachází.

SKLADOVÁNÍ

Souprava Rota-Adeno-Noro může být skladována při teplotě mezi +2 °C až +30 °C. Její doba použitelnosti je uvedena na hliníkové obálce.

Reakční stripy se musí po otevření ochranného obalu použít jednou při pokojové teplotě (pokud jsou skladovány v chladu).

Výrobek si po otevření zachovává deklarovanou stabilitu.

VZORKY

- Tento výrobek je určen pro analýzu lidských fekálních vzorků. Vzorky je třeba odebírat co nejdříve po manifestaci příznaků (průjem a zvracení), neboť vylučování viru do stolice je nejvyšší během prvních tří dnů po infekci.

- Nepoužívejte vzorky, které byly odebrány do transportního media, neboť ty obsahují konzervační agens, (jako je formalín, SAF, PVA apod.) nebo obohacující látky jejichž přítomnost by mohla ovlivňovat správný průběh reakce.

- Nejlepší výsledky získáte z čerstvé, neošetřené stolice. Pokud je třeba vzorek uchovávat, pak nejlépe v lednici (+2 °C až 8 °C) 1 až 2 dny. Delší dobu lze vzorky uchovat zmražené do -20 °C, nicméně mějte na zřeteli, že zmražením může dojít ke ztrátě aktivity.

- Zvláštní pozornost věnujte analýze hemoragických vzorků, neboť ty obvykle způsobují problémy s ne specificitou, pokud je obsah krve vysoký. Indikací této nestability testu je obvykle změna zelené barvy v kontrolní linii.

- U zmraženého vzorku se ujistěte, že je před testem zcela rozmražen a temperován na pokojovou teplotu..

- Zabraňte opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorku, které by mohlo ovlivnit imunochemické rozeznání viru.

PŘÍPRAVA FEKÁLNÍHO VZORKU

Obecná pozn.: během celého postupu je třeba nosit ochranné osobní pomůcky, neboť jde o práci s infekčním materiálem. Po ukončení práce nezapomeňte provést všechna hygienická opatření uvedená v bodě 4 v odstavci "Opatření".

Protokol pro přípravu fekálního vzorku je:

1. Vzorek nejdříve homogenizujte, abyste získali maximálně reprezentativní vzorek.
2. Odšroubujte víčko lahvičky a dejte pozor, aby nedošlo k vystříknutí dilučního pufru vzorku. Pevný vzorek odeberte tyčkou připojeno k víčku lahvičky v množství cca 110 mg stolice (malá porce o průměru 5 mm). Pokud je vzorek polotekutý, ale není možné jej vzít pipetou) vezměte množství zcela pokrývající drážky na tyčince připojené k víčku lahvičky. Nebo přidejte 110 ml. Pokud je vzorek tekutý odeberte 110 µl (4 kapky pomocí jednorázové pipetky dodávané v soupravě).
3. Opatrně toto množství přidejte do lahvičky s dilučním pufrům vzorku v lahvičkách v soupravě. Víčko dobře zašroubujte a protřepejte, aby byla směs homogenizována.
4. Po extrakci by měla být stolice okamžitě analyzována jednoduchým testem Simple Rota-Adeno-Noro (viz část „Postup testu“).

POSTUP

1. Vyjměte reakční kazetku z hliníkového sáčku a sáček zlikvidujte (jeho úkol byl chránit test před vlhkostí).
2. Odlomte špičku víčka lahvičky.
3. Otočte lahvičku a kápněte 4 kapky do oblasti aplikace vzorku na každém stripu (čtvercové okénko označené šipkou). Udělejte to tak, abyste nepřidali pevné částice)
4. Počkejte 15 minut, než bude možné odečíst a interpretovat výsledky.

ODEČÍTÁNÍ VÝSLEDKŮ

Šest obrázků, které jsou na obr 1 a 2 ilustrují různé výsledky, které je možné získat.

Na každém stripu se objeví různé barevné linie vymezené černou horizontální linií vytištěnou na obou stranách kazetky.

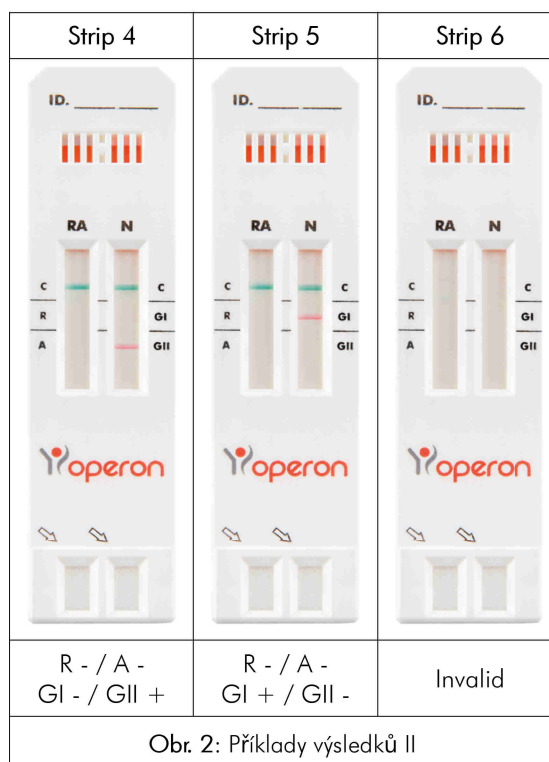
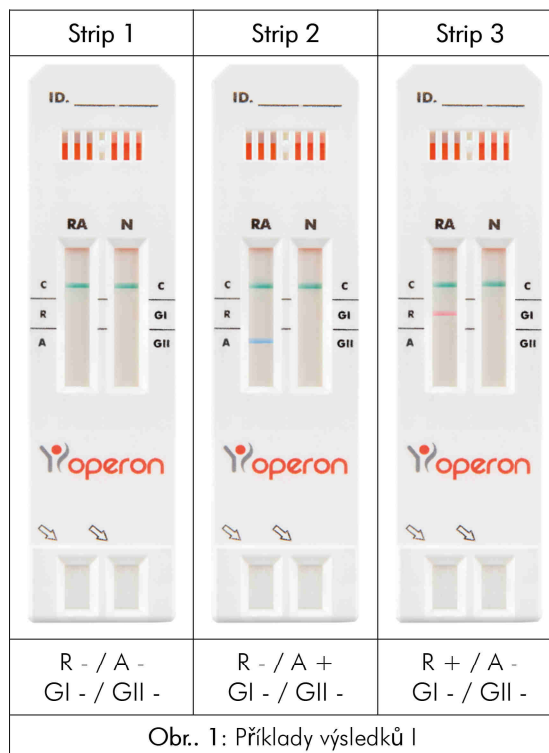
Obr.1. Rota-Adeno strip:

- a. Modrá linie: indikuje přítomnost adenoviru ve vzorku.
- b. Červená linie: indikuje přítomnost rotaviru ve vzorku.
- c. Zelená linie: kontrolní linie, která indikuje, že test byl proveden dobře.

Obr.2. Norovirus strip:

- a. Spodnější červená linie: indikuje přítomnost noroviru genové skupiny II ve vzorku.
- b. Vrchnější červená linie: indikuje přítomnost noroviru genové skupiny I ve vzorku.
- c. Zelená linie: kontrolní linie, která se musí vždy objevit, indikuje, že test byl proveden dobře.

Zelená kontrolní linie by se měla objevit vždy na obou stripech. Přítomnost dalších linií indikuje přítomnost adenoviru a/nebo rotaviru a/nebo noroviru.



- **Strip 1: NEGATIVNÍ výsledek**
Je zde pouze jedna vodorovná ZELENÁ linie na obou stripech zarovnaná s písmenem "C" na obou stranách kazetky. To jsou kontrolní linie, které by se měly objevit vždy a indikují řádný průběh chromatografie na obou stripech.
- **Stripy 2-5: POZITIVNÍ výsledek**
- **Strip 2: Adenovirus pozitivní**
Na stripu Rota-Adeno se objevila ZELENÁ linie zarovnaná s písmenem "C" a MODRÁ linie zarovnaná s písmenem "A". na stripu pro Norovirus se objevila pouze

ZELENÁ linie zarovnaná s písmenem "C".

- **Strip 3: Rotavirus pozitivní**

Na stripu Rota-Adeno se objevila **ZELENÁ** linie zarovnaná s písmenem "C" a **ČERVENÁ** linie zarovnaná s písmenem "R". Na stripu pro Norovirus se objevila pouze **ZELENÁ** linie zarovnaná s písmenem "C".

- **Strip 4: Norovirus GII pozitivní**

Na stripu pro Norovirus se objevila **ZELENÁ** linie zarovnaná s písmenem "C" a **ČERVENÁ** linie zarovnaná s písmenem "GII". Na stripu Rota-Adeno se objevila pouze **ZELENÁ** linie zarovnaná s písmenem "C".

- **Strip 5: Norovirus GI pozitivní**

Na stripu pro Norovirus se objevila **ZELENÁ** linie zarovnaná s písmenem "C" a **ČERVENÁ** linie zarovnaná s písmenem "GI". Na stripu Rota-Adeno se objevila pouze **ZELENÁ** linie zarovnaná s písmenem "C".

- **Strip 6: NEVALIDNÍ výsledek**

Neobjevila se žádná zelená kontrolní linie, zelená barva je zcela jiná nebo se objevily neočekávané a nespecifické barvy na pozicích pozitivních linií. To je důsledkem toho, že test nepracoval správně. Příčiny mohou být následující:

- Jedna nebo několik reagií bylo znehodnoceno a výrobek proexpiroval.

- Vzorek nebyl připraven podle pracovního návodu.

- Vzorek obsahoval velké množství krve.

V případě nevalidního výsledku se doporučuje opakovat test s novou kazetkou a důsledně dodržovat pokyny pro použití v tomto příbalovém letáku. Pro vzorky s krví se doporučuje použít alternativní metodu, neboť problém není závislý na stripu, ale na matrixu vlastního vzorku. Ostatní komerčně dodávané soupravy pro rychlou diagnostiku mají stejný problém se vzorky s obsahem krve. Jakákoliv linie, která by se mohla dodatečně objevit po 5 minutách nemá diagnostickou hodnotu.

POZNÁMKA: Závěrečná a konečná diagnóza by měla být provedena klinikem. Tento test pouze detekuje rotaviry, adenoviry a noroviry ve vzorku. Neurčuje, zda konečným důsledkem pacient v trpí kvůli infekci virem.

Test lze odečítat vizuálně nebo pomocí čtečky OPERON Lateral Flow Reader. K interpretaci testu pomocí čtečky je k dispozici rychlý průvodce na následujícím webu: <https://operon.com/operon-lateral-flow-reader/>

Důležité: před vložením testu do čtečky se ujistěte, že ve výsledkovém okně nejsou žádné prachové částice, vlákna atd., protože by mohly rušit odečet

KONTROLA KVALITY

Test je neplatný, pokud se neobjeví **ZELENÁ** čára, protože test nebyl proveden správně nebo se znehodnotila činidla. V takovém případě test zopakujte a postupujte přesně podle pracovního protokolu uvedeného v tomto návodu k použití.

UPOZORNĚNÍ: doporučuje se zahrnout naše kontroly se známým výsledkem, aby bylo zajištěno získání správných údajů.

OMEZENÍ POSTUPU

1. The Simple Rota-Adeno-Noro test je určen pro pomoc v diagnostice gastrointestinálních infekcí způsobených rotaviry adenoviry a noroviry, za účelem diferenciální diagnostiky rotavirů, adenovirů, a norovirů GI and GII. V případě, že virová nálož je stejná nebo vyšší než detekční limit výrobku pro každý analyt.

2. Tento výrobek stanovuje kvalitativní, ne kvantitativní výsledky, nicméně intenzita pozitivních linií odpovídá množství viru detekovatelného ve fekálním vzorku.

3. Při analýze velkého počtu stolic test vykazoval dobrou korelaci s ostatními metodami (jako RT-PCR, ELISA a rychlé testy). Nicméně tato studie nevyklučuje možné interference při analýze některých vzorků stolic.

4. Test Simple Rota-Adeno-Noro nebyl validován pro všechny genotypy noroviru schopné nakazit člověka, a tudíž může pochybit v detekci noroviru v důsledku velké antigenní diverzity aktuálního kmene

5. Vadný vzorek může vést k velice slabému pozitivnímu výsledku. Pokud se to objeví test je třeba opakovat s větším množstvím vzorku. Na druhé straně příliš velké množství může způsobit pomalý průběh nebo zabránit, aby se dobře vyvinul (nejsou viditelné kontrolní linie. Pak je třeba test opakovat s menším množstvím vzorku. (viz. odstavec "Příprava vzorku stolice").

6. Negativní výsledek nevyklučuje možnost infekce rotaviry a/nebo adenoviry a/nebo noroviry. To, že viry nebyly detekovány může být důsledkem faktorů jako: odběr vzorku v nevhodném stadiu onemocnění (pokud je pouze málo viru eliminováno stolicí); nesprávné skladování vzorku; nevhodný transport; přítomnost genotypu, který strip detekovat neumí.

7. Pozitivní výsledek nevyklučuje přítomnost jiných patogenních agens, včetně koinfekce některých z těchto virů s jinými mikroorganismy. V každém případě infekce je třeba dále potvrdit diferenciální diagnostikou.

8. Bylo pozorováno, že vzorky stolice s vysokým obsahem krve negativně interferují s testem s možnými problémy nespecifity u vzorků, které jsou negativní pro rotavirus, adenovirus a norovirus. Tato nestabilita testuje obvykle doprovázena změnou zbarvení kontrolní linie (viz obr v odstavci "Odečítání výsledků").

9. Výsledky testu by měly být také interpretovány v souvislosti s epidemiologickými studiemi, klinickým obrazem pacienta a dalšími diagnostickými postupy.

10. Důležité je sledování reakční doby. Pokud je reakční doba kratší, než je uvedeno, lze jasně pozorovat vzorky obsahující množství analytu nad limitem citlivosti, ale ty na limitu se neobjeví. Pokud je reakční doba delší, než je uvedeno, ovlivní to citlivost testu a může vést k nesprávným interpretacím.

11. Test může vést také k pozitivním výsledkům u pacientů, kterým byla podána vakcína RotaTeq méně než 15 dní před odběrem vzorku.

12. Provedení testu nebylo stanoveno k ověření účinnosti eradikace (testu vyléčení).

13. Analýza některých vzorků může způsobit nedefinované barevné čáry, způsobené ve většině případů negativními vzorky. Pokud se objeví nedefinované barevné čáry, test by se měl opakovat. Pokud se znovu získá stejný výsledek, měla by být analýza provedena pomocí jiné analytické metody.

14. Provedení testu nebylo stanoveno u novorozenců a předčasně narozených dětí.

DETEKČNÍ SCHOPNOST

Detekční možnosti testu interpretovaného vizuálně a pomocí OPERON Lateral Flow Reader jsou definovány pro každý analyt následovně:

- Rota-Adeno strip: pro adenovirus, při použití antigenu adenoviru (VirionSerion) jako standardu, je průměrná senzitivita 16 ng/ml

Pro rotaviry při použití Rotavirus A kmen VR-2018TM (ATCC) jako standardi schopnost detekce při ředění dilučním puřremr byla stanovena na 1.17×10^4 TCID₅₀/ml. V případě použití fekálního extraktu pro ředění kmene detekční schopnost byla 1.88×10^5 TCID₅₀/ml přestože až 9.38×10^4 TCID₅₀/ml can be detected.

- Norovirus strip: průměrné senzitivita dosažené při použití rekombinantních VLP norovirů (nativní antigen) jako standardu jsou 3,25 ng/ml pro norovirus GI a 0,625 ng/ml pro norovirus GII

ANALYTICKÁ SPECIFICITA

- Monoklonální protilátky použité na stripu Rota-Adeno jsou jedinečně specifické pro protein VP6 rotaviru (hlavní kapsidový protein) a hexonový protein adenoviru typu 2 (vysoce konzervovaný).

- Monoklonální protilátky použité na stripu proti norovirům specificky rozpoznávají vysoce konzervované epitopy v genových skupinách I a II.

Nebyly zjištěny žádné zkřížené reakce s jinými antigeny a/nebo mikroorganismy přítomnými ve vzorcích stolice. Viz oddíl o zkřížené reaktivitě.

DIAGNOSTICKÁ SENZITIVITA A SPECIFICITA

A. Interní hodnocení OPERON

A.1- Simple Rota-Adeno-Noro byl analyzován proti následujícím vzorkům:

- 52 vzorků negativních pro rotavirus
- 58 vzorků negativních pro adenovirus
- 71 vzorků negativních pro norovirus GI a GII
- 30 vzorků pozitivních pro rotavirus

- 16 vzorků pozitivních pro adenovirus
- 8 vzorků pozitivních pro norovirus GI
- 68 vzorků pozitivních pro norovirus GII

Referenčními technikami byly:

- ELISA ProSpecT Rotavirus Microplate Assay od firmy Oxoid pro vzorky negativní na rotavirus.
- RT-PCR metodou popsanou v publikaci „European Rotavirus Detection and Typing Methods“. (<https://www.eurorotanet.com/project-information/documents-and-methods/>) pro vzorky pozitivní na rotavirus
- RT-PCR pomocí metod popsaných Vinjé J et al.¹³, Kageyama T, et al.¹⁴. y Sabrià A, et al.¹⁵ pro vzorky noroviru GI a GII.
- Rychlý test CerTest Adenovirus pro vzorky negativní a pozitivní na adenovirus.

Výsledky získané vizuální interpretací testu byly následující:

ROTAVIRUS		RT-PCR Rotavirus	
		Positive	Negative
Simple test <u>Rota-Adeno-Noro</u>	Positive	30	-
	Negative	0	-
Shoda senzitivity = $30/(30+0)*100 = >99.9\%$			
ROTAVIRUS		ELISA ProSpecT Rotavirus	
		Positive	Negative
Simple test <u>Rota-Adeno-Noro</u>	Positive	-	0
	Negative	-	52
Shoda specificity = $52/(52+0)*100 = >99.9\%$			
ADENOVIRUS		CerTest Adenovirus	
		Positive	Negative
Simple test <u>Rota-Adeno-Noro</u>	Positive	16	0
	Negative	0	58
Shoda senzitivity = $16/(16+0)*100 = >99.9\%$			
Shoda specificity = $58/(58+0)*100 = >99.9\%$			

NOROVIRUS GII		RT-PCR Norovirus	
		Positive	Negative
Simple test <u>Rota-Adeno-Noro</u>	Positive	63	2
	Negative	5	69
Shoda senzitivity = $63/(63+5)*100 = 92.6\%$			
Shoda specificity = $69/(69+2)*100 = 97.2\%$			

NOROVIRUS GI		RT-PCR Norovirus	
		Positive	Negative
Simple test Rota-Adeno-Noro	Positive	6	2
	Negative	2	69
$\text{Shoda senzitivity} = 6/(6+2)*100 = 75.0 \%$ $\text{Shoda specificity} = 69/(69+2)*100 = 97.2 \%$			

A.2- Detekce rotavirů pomocí Simple Rota-Adeno-Noro test byly hodnoceny na celkem 179 vzorcích analyzovaných pomocí RIDASCREEN® Rotavirus ELISA od R-Biopharm jako referenční metody.

Výsledky získané vizuální interpretací testu byly následující:

ROTAVIRUS		ELISA RIDASCREEN® Rotavirus	
		Positive	Negative
Simple test Rota-Adeno-Noro	Positive	37	3
	Negative	2	137
$\text{Shoda senzitivity} = 37/(37+2)*100 = 94.9\%$ $\text{Shoda specificity} = 137/(3+137)*100 = 97.9\%$			

Dva ze tří diskrepantních falešně pozitivních výsledků byly analyzovány pomocí RT-PCR. Jeden z nich dal pozitivní výsledek pro rotaviry, s tím, že byl falešně negativní výsledek RIDASCREEN® Rotavirus ELISA. Další vzorek dal negativní výsledek pro rotaviry, tudíž byl falešně pozitivní výsledek OPERON testu.

Třetí falešně pozitivní vzorek byl analyzován jiným Immunochromatografickým testem pro detekci rotavirových antigenů, vydal negativní výsledek indikující že se jednalo o falešně pozitivní výsledek OPERON testu.

Co se týká dvou diskrepantních falešně negativních vzorků, byl jeden z nich testován metodou RT-PCR s negativním výsledkem svědčícím o tom, že se jednalo o falešně pozitivní výsledek RIDASCREEN® Rotavirus ELISA. Druhý vzorek byl testován jiným rychlým testem a dal také negativní výsledek.

A.3- Detekce rotavirů pomocí Simple Rota-Adeno-Noro test byla hodnocena na celkem 179 vzorcích analyzovaných Immunochromatografickými testy Rota-Strip od CorisBioConcept jako referenční metody.

Výsledky získané vizuální interpretací testu byly následující:

ROTAVIRUS		Rota-Strip	
		Positive	Negative
Simple test Rota-Adeno-Noro	Positive	36	4
	Negative	0	139
$\text{Shoda senzitivity} = 36/(36+0)*100 = >99.9 \%$ $\text{Shoda specificity} = 139/(4+139)*100 = 97.2\%$			

Tři ze čtyřech rozdílných falešně pozitivních vzorků bylo testováno pomocí RT-PCR. Dva z nich byly pozitivní na rotaviry, svědčící o tom, že se jednalo o falešně negativní pro Rota-Strip test. Další vzorek, testovaný pomocí RT-PCR byl negativní, což potvrzuje falešnou pozitivitu OPERON testu.

Čtyři falešně pozitivní vzorky byly testovány pomocí enzyme-linked immunoassay (ELISA), s negativním výsledkem a svědčí o tom, že výsledky OPERON testu byly falešně pozitivní.

B.- Externí hodnocení OPERON.

Test Simple Rota-Adeno-Noro byl hodnocen na 173 vzorcích charakterizovaných pomocí referenční metody RT-PCR (BD MAXTM, Becton Dickinson) na rotaviry, adenoviry a noroviry. Na základě této charakterizace bylo rozdělení následující:

- 113 vzorků bylo negativních na rotavirus.
- 119 vzorků negativních na adenovirus.
- 118 vzorků negativních na norovirus GI a GII.
- 60 vzorků pozitivních na rotavirus (Ct mezi 10,4 a 33,6)
- 54 vzorků pozitivních na adenovirus (Ct mezi 7,8 a 27,7)
- 55 vzorků pozitivních na norovirus (Ct mezi 17,2 a 33,5)

50 z 55 vzorků pozitivních na norovirus bylo genotypizováno pomocí PCR metodou popsanou Cannonem JL et al.¹², výsledkem bylo 36 vzorků pozitivních na GII a 15 vzorků pozitivních na GI, přičemž jeden ze vzorků byl pozitivní jak na GI, tak na GII.

Výsledky získané vizuální interpretací testu byly následující:

ROTAVIRUS		RT-PCR Rotavirus	
		Positive	Negative
Simple test Rota-Adeno-Noro	Positive	43	0
	Negative	17	113
$\text{Shoda senzitivity} = 43/(43+17)*100 = 71.7 \%$ $\text{Shoda specificity} = 113/(0+113)*100 = >99.9\%$			

Sedmnáct neshodných vzorků bylo analyzováno pomocí jiného imunochromatografického testu na detekci antigenů rotaviru, přičemž oba byly rovněž falešně negativní opotí RT-PCR (BD MAXTM, Becton Dickinson). Výsledky lze odůvodnit rozdílem v citlivosti molekulárních metod (PCR) a imunochromatografie.

ADENOVIRUS		RT-PCR Adenovirus	
		Positive	Negative
Simple test Rota-Adeno-Noro	Positive	41	1
	Negative	13	118
Shoda senzitivity = $41/(41+13)*100= 75.9 \%$ Shoda specifity = $118/(1+118)*100= 99.2\%$			

Rozdíly v citlivosti, 13 falešně negativních výsledků, lze odůvodnit rozdílem v citlivosti mezi technikami PCR a imunochromatografie. Kromě toho 11 falešně negativních výsledků nebylo zjištěno ani pomocí jiného imunochromatografického testu na detekci antigenů adenoviru.

Pokud jde o specifičnost, falešně pozitivní vzorek z jednoduchého testu Rota-Adeno-Noro byl potvrzen také pomocí jiného imunochromatografického testu na detekci antigenů adenovirů, což naznačuje, že by se mohlo jednat o konfliktní vzorek pro tuto techniku nebo o pravý pozitivní vzorek.

NOROVIRUS (GI+GII)		RT-PCR Norovirus	
		Positive	Negative
Simple test Rota-Adeno-Noro	Positive	48	0
	Negative	7	118
Shoda senzitivity = $48/(48+7)*100= 87.3 \%$ Shoda specifity = $118/(0+118)*100=>99.9 \%$			

Hodnotu shody citlivosti lze odůvodnit na základě rozdílu v citlivosti mezi metodami PCR a imunochromatografie. Kromě toho 7 falešně negativních výsledků testu Simple Rota-Adeno-Noro nebylo detekováno ani pomocí jiného imunochromatografického testu pro detekci antigenů noroviru.

NOROVIRUS GII		RT-PCR Norovirus	
		Positive	Negative
Simple test Rota-Adeno-Noro	Positive	34	0
	Negative	2	118
Shoda senzitivity = $34/(34+2)*100= 94.4 \%$ Shoda specifity = $118/(0+118)*100=>99.9 \%$			

NOROVIRUS GI		RT-PCR Norovirus	
		Positive	Negative
Simple test Rota-Adeno-Noro	Positive	10	0
	Negative	5	118
Shoda senzitivity = $10/(10+5)*100= 66.7 \%$ Shoda specifity = $118/(0+118)*100=>99.9 \%$			

Poznámka: jedním z falešně negativních výsledků GI při použití testu Simple Rota-Adeno-Noro je pozitivní vzorek GI a GII. Stojí za zmínku, že tento vzorek je detekován jako pozitivní na GII.

OPAKOVATELNOST

PŘESNOST UVNITŘ TESTU

Pět opakování série 1/2 ředění charakterizovaných vnitřními standardy (křivka citlivosti) spolu se skutečnými vzorky stanovenými jako NC ("negativní kontrola"), LPC ("nízko pozitivní kontrola") a PC ("pozitivní kontrola") pro každý analyt detekovaný testem bylo měřeno ve stejný den stejnou osobou. Bylo dosaženo vysoké opakovatelnosti s rozdíly mezi opakováními standardu pro každý analyt rovnými nebo nižšími než jedno 1/2 ředění a výsledky se skutečnými vzorky byly stejné.

REPRODUKOVATELNOST

• PŘESNOST MEZI DNY

S použitím stejné šarže jednoduchého testu Rota-Adeno-Noro byla pro každý analyt v průběhu pěti dnů v časovém odstupu měřena křivka citlivosti ve dvou opakováních. Pro analyty Rotavirus, Adenovirus a Norovirus GII bylo dosaženo 100% reprodukovatelnosti. U noroviru GI byly rozdíly v průběhu dvoudenního období pouze jedna polovina 1/2 ředění.

• PŘESNOST MEZI OPERÁTORY / INTERLABORATORNÍ

Tři osoby měřily křivku citlivosti pro každý analyt třikrát. V žádném případě nebyly zjištěny rozdíly větší než jedno 1/2 ředění.

• PŘESNOST MEZI ŠARŽEMI

Tři různé šarže testu Simple Rota-Adeno-Noro byly vyhodnoceny paralelně analýzou typických křivek citlivosti pro tento test. Analýza byla provedena jednou osobou ve stejný den, vizuálně a pomocí OPERON Lateral Flow Readeru. Největší rozdíly byly menší nebo rovné jednomu 1/2 ředění, což poskytlo důkaz o vysoké přesnosti testu mezi šaržemi.

HOOKŮV NEBO PROZONOVÝ EFEKT

Bylo ověřeno, že jednoduchý test Rota-Adeno-Noro: interpretovand vizuálně a pomocí OPERON Lateral Flow Readeru.:

1. Nevykazuje Hookův efekt pro rotaviry, jak bylo prokázáno v hodnocení pro Rotavirus A, VR-2018™ kmen (ATCC) až do koncentrace $f\ 3 \times 10^6$ TCID₅₀/ml.
2. Nevykazuje Hookův efekt u skutečně silně pozitivních vzorků na adenovirus, ačkoli velmi vysoké koncentrace virového antigenu ($\geq 16\ 250$ ng/ml) mírně snižují intenzitu signálu. Žádný z četných hodnocených vzorků nevykazoval virové koncentrace v tomto rozmezí.
3. Nevykazuje Hookův efekt pro Norovirus (GI/GII), jak bylo prokázáno vyhodnocením až 10 000 ng/ml VLP (ekvivalent 5,86*10¹¹ virových částic/ml).

INTERFERING SUBSTANCES

Následující látky neovlivnily vizuální výsledky testu, když byly přidány do vzorků stolice (pozitivní a negativní) v koncentracích uvedených v následující tabulce:

Loperamide	4.5 µg/ml	Ibuprofen	1.080 mg/ml
Racecadotril	0.135 mg/ml	Paracetamol	1.125 mg/ml
Palmitic acid	20% (w/w)	Acetylsalicylic acid	0.9 mg/ml
Mucin	2.5% (w/w)	Sucrose	1.5 mg/ml
Sodium bicarbonate (Alka-Seltzer)	3.78 mg/ml	Whole blood	0.16 % (v/v)
Ciprofloxacin	0.225 mg/ml	Atropine sulphate (B. Braun atropine)	0.315 µg/ml
Omeprazole	27 µg/ml	Metronidazole	0.225 mg/ml
Amoxicillin	0.9 mg/ml	Vancomycin	0.9 mg/ml

ZKŘÍŽENÁ REAKTIVITA

Při interpretaci vizuální nebo pomocí OPERON Lateral Flow Readeru, nebyla detekována žádná zkřížená reaktivita s následujícími mikroorganismy: *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*, *Adenovirus*, *Rotavirus*, *Norovirus* GI/GII, a *Astrovirus*.

V případě koncentrací *Giardia lamblia*, nad 2,75 x 10⁶ cel/ml f cysts/trophozoitů ses může objevit zkřížená reaktivita pro noroviry GII, ačkoliv nebyla potvrzena pro silně pozitivní vzorky *Giardia*.

MODIFIKACE OPROTI PŘEDCHOZÍ VERZI DOKUMENTU

Struktura obecných informací poskytovaných na začátku pokynů je vylepšena a obsahuje jednotlivé body, aby byly v souladu s požadavky nařízení IVDR.

Komponenty stavebnice jsou lépe rozepsané.

Shoda hodnot mezi interpretacemi testu vizuálně nebo pomocí čtečky OPERON stripů jsou aktualizovány.

Pokud jde o výkonnostní parametry testu, byly změněny následující části: "Upozornění", "Příprava vzorku", "Omezení postupu", "Detekční schopnost", "Diagnostická senzitivita a specifita", "Opakovatelnost", "Reprodukovatelnost", "Hook efekt", "Interferující látky" a "Cross-reaktivita"

ODKAZY - LITERATURA

1. F. Bon et al. Prevalence of a group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. Journal of Clinical Microbiology, Sept. 1999, p. 3055-3058
2. Bodo R. Eing et al. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of human rotaviruses in fecal specimens. Journal of Clinical Microbiology, Dec. 2001, p. 4532-4534
3. Umesh D. Parashar et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. Emerging Infectious Diseases, vol. 9, No.5, May 2003, p. 565-572
4. Atmar RL and Estes MK. Diagnosis of non-cultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. Clinical Microbiology Reviews, 2011. Vol: 14 (pp: 15-37).
5. Ribes Fernández JM and Buesa Gómez J. Infecciones por Norovirus. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2010. Vol: 28 (pp: 51-55).
6. Patel MM, Hall AJ, Vinjé J and Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. Journal of Clinical Virology, 2009. Vol: 44 (pp: 1-8).
7. Buesa J, Montava R, Abu-Mallouh R, Fos M, Ribes JM, Bartolomé R, Vanaclocha H, Torner N and Domínguez A. Sequential evolution of Genotype GII.4 Norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain. Journal of Medical Virology, 2008. Vol: 50 (pp: 1288-1295).
8. Siebenga J, Kroneman A, Vennema H, Duizer E and Koopmans M. Food-borne viruses in Europe network report: the norovirus GII.4 2006b (for US named Minerva-like, for Japan Kobe034-like, for UK V6) variant now dominant in early seasonal surveillance. Eurosurveillance, Jan-Mar 2008. Vol: 13 (Issues 1-3).
9. Okame M, Akihara S, Hansman G, Hainian Y, Tran HT, GiaPhan T, Yagyu F, Okitsu S and Ushijima H. Existence of multiple Genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of Norovirus

infection in Japan. Journal of Medical Virology, 2006. Vol: 78 (pp: 1318-1324).

10. Hoonmo L. Koo and Herbert L. DuPont. Noroviruses as a potential cause of protracted and lethal disease in immunocompromised patients. Clinical Infectious Disease, 2009. Vol: 49 (pp: 1069-71).

11. Adissa Tran et al. Prevalence of Rotavirus, Adenovirus, Norovirus, and Astrovirus Infections and Coinfections among Hospitalized Children in Northern France. Journal of Clinical Microbiology, May 2010; 48(5): 1943-6.

12. Cannon JL et al. Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses. Journal of Clinical Microbiology, July 2017; Vol 55(7) (pp: 2208-2221).

13. Vinjé J et al. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. J Infect Dis. 1996 Sep;174(3):610-5.

14. Kageyama T, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol. 2003 Apr;41(4):1548-57.

15. Sabrià A, et al. Catalan Viral Gastroenteritis Study Group. Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant. J Clin Virol. 2014 Jun;60(2):96-104

Tento dokument je také dostupný na našich webových stránkách

www.operondx.com



DO-0905151 Rev. 4 08-08-2023



OPERON, S.A.. - Camino del Plano, 19 -E-50410

Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – ESPAÑA



Použití, DATUM EXPIRACE

LOT

Číslo šarže

IVD

Pro jedno použití



Tento výrobek splňuje podmínky Direktivy 98/79/EC pro in vitro diagnostické zdravotnické prostředky

REF

Katalogové číslo



Podívejte se na pokyny pro používání



Výrobce



Obsah vhodný pro <n> testů



Pozor



Pouze pro jedno použití



Omezení teploty



Prostředek není určen pro testování v blízkosti pacienta



Prostředek není určeno pro sebetestování