

Szybki „one-step” test do wykrywania norowirusów w próbkach kału ludzkiego.  
Test przeznaczony tylko do użytku profesjonalnego do diagnostyki in vitro.

#### PRZEZNACZENIE TESTU

Test jest szybkim immunochromatograficznym testem kasetykowym używanym do jakościowej oceny występowania norowirusów genogrupy I i II w próbkach kału ludzkiego.

#### WPROWADZENIE

Norowirusy są genetycznie zróżnicowaną grupą jednoniciowych wirusów RNA bez ołoczki lipidowej, należących do rodziny kaliciwirusów. Przez dekady określane SRSV (small round structured viruses) jak również „wirusy Norwalk-podobne”. Dopiero techniki molekularne pozwoliły na dokładne określenie taksonomii. Wewnątrz rodzaju Norovirus zostały wyodrębnione 3 genogrupy: genogrupy I i II zostały powiązane z chorobami u ludzi, natomiast genogrupa III została powiązana z chorobą u świń i krów.

Norowirusy uważa się za główną przyczynę występowania ostrych biegunk u ludzi. Są one wysoce zakaźne (uznano, że już 10 cząstek wirusa może spowodować zakażenie) i przyczyniają się do wysokiej zachorowalności w takich placówkach jak szpitale, domy opieki, restauracje oraz w trakcie rejsów wycieczkowych. Dlatego też, infekcje norowirusem uważa się za rosnący problem zdrowia publicznego. Do infekcji może dojść poprzez kontakt z chorymi osobami, przedmiotami, powierzchniami zanieczyszczonymi cząstkami wirusa pochodzącego z kału lub wymiocin, a także poprzez powietrze w przypadku powstawania aerozoli przy wymiotach. Do zakażenia może dojść także poprzez zanieczyszczoną wodę. Objawami zakażenia norowirusem zazwyczaj są nudności, wymioty, biegunka i skurcze żołądka. Dodatkowo mogą pojawić się: stan podgorączkowy, dreszcze, ból głowy, bóle mięśni oraz osłabienie. Przebieg choroby jest zazwyczaj gwałtowny, ale łagodny i samoograniczający się. Choroba objawia się po 12 – 24 godzinach inkubacji i trwa zazwyczaj 1 – 2 dni. Generalnie, u dzieci wymioty występują z większą częstotliwością niż u dorosłych. W przypadku niemowląt, ludzi starszych i u ludzi o obniżonej odporności nieleczona choroba może zakończyć się śmiercią.

#### ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Test jest jakościowym testem immunochromatograficznym pozwalającym na detekcję norowirusa w próbkach kału ludzkiego. W teście zastosowano cząsteczki pokryte przeciwciałami monoklonalnymi skierowane przeciwko antygenom genogrupy I i II, oraz przeciwciała skierowane przeciwko antygenom genogrupy I i II, którymi pokryta została membrana testu w rejonie testowym. Podczas analizy, rozcieńczona (za pomocą buforu ekstrakcyjnego dostarczonego z testem) próbka kału zostaje naniesiona na okienko i dzięki zjawiskom kapilarnym migruje w górę po membranie testu, napotykając przeciwciała z genogrupy I i II, generując kolorowe linie odpowiednio na poziomie linii testowych T1 i T2. Obecność kolorowej linii w rejonie T1 wskazuje na wynik pozytywny dla genogrupy I, a w T2 dla genogrupy II. Brak kolorowej linii oznacza wynik negatywny. Pozostały rozwój przesuwa się w kierunku odczytnika kontrolnego i wiąże się z kontrolą kontrolnym, tworząc czerwoną linię kontrolną (C), która potwierdza prawidłowe działanie testu oraz to, że odpowiednia objętość próbki została naniesiona na membranę, pozwalając na jej przesłanie.

#### SRODKI OSTROŻNOŚCI

- Test przeznaczony tylko do diagnostyki in vitro. Nie używać po terminie ważności.
- Test kasetykowy powinien pozostać w szczelnie zamkniętym opakowaniu do czasu przeprowadzenia badania
- Nie należy jeść, pić, palić w pomieszczeniu gdzie wykonuje się badania
- Nie używać testu jeśli opakowanie jest uszkodzone
- Należy zachować szczególną ostrożność. Odpady należy usuwać zgodnie z narodowymi lub lokalnymi wytycznymi, dotyczącymi usuwania odpadów. Chociaż pozytywna kontrola w teście została inaktywowana, należy traktować ją jako materiał potencjalnie zakaźny i wyrzucić po uprzednim zneutralizowaniu.
- Należy stosować ubranie ochronne: rękawiczki, fartuch, okulary. Rękawiczki oraz zużyte kasety należy utylizować zgodnie z GLP (Good Laboratory Practice) oraz zgodnie z lokalnymi regulacjami.
- Wilgotność i temperatura odbiegające od optymalnych warunków przechowywania mogą wpłynąć na wynik testu.

#### PRZECZYSZCZANIE I TRWAŁOŚĆ

Przechowywać w oryginalnych, szczelnie zamkniętych opakowaniach zawierających pochłaniacz wilgoci, w temperaturze pokojowej lub w lodówce (2-30°C), do końca upływu terminu ważności, umieszczonego na opakowaniu. **NIE ZAMRAŻAĆ.** Nie używać po terminie ważności. Nie otwierać opakowania jednostkowego zawierającego test, dopóki nie osiągnie temperatury pokojowej, aby uniknąć kondensacji pary wodnej na membranie.

#### POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE PROBKÓW

Próbkę kału należy pobrać jak najszybciej po wystąpieniu objawów zakażenia. Wykazano, że maksymalne wydalanie norowirusa w kale pacjentów przypada na 3-13 dzień po wystąpieniu objawów. Jeśli próbka jest pobrana długo po wystąpieniu biegunki, liczba antygenów może być niewystarczająca, aby uzyskać reakcję dodatnią lub może nie mieć związku z wystąpieniem biegunki.

- Próbka kału musi być pobrana do czystego, suchego, wodoszczelnego pojemnika, niezawierającego detergentów, konserwantów.
- Przed użyciem należy doprowadzić wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej

#### MATERIAŁY

##### Materiały dostarczone

- Test kasetykowy (10 sztuk w zestawie); Instrukcja dla testu (polski, ang.)
- Próbówka reakcyjna z buforem ekstrakcyjnym

##### Materiały wymagane, ale niedostarczone

- Pojemniki na próbki kału
- Zakraplacz, Minutnik
- Wirówka i pipeta do pobierania 80 ul jeśli wymagane

#### WYKONANIE ANALIZY

Przed rozpoczęciem analizy należy doprowadzić test, próbkę oraz bufor do temperatury pokojowej (15-30°C). Próbkę należy opisać nazwiskiem pacjenta lub jego numerem identyfikacyjnym.

##### 1. Pobieranie próbek:

Aby uzyskać wystarczającą liczbę wirusów, należy pobrać odpowiednią ilość kału (1-2 ml lub 1-2 g) do czystego, suchego pojemnika. Najlepsze wyniki uzyskuje się jeśli test jest wykonany w ciągu 6 godzin od pobrania próbki. Jeśli w tym czasie analiza nie jest wykonana, próbki mogą być przechowywane przez 3 dni w temperaturze 2-8°C, przy dłuższym przechowywaniu, muszą być zamrożone w temperaturze -20°C.

##### 2. Próbkę kału należy pobrać i przenieść do próbki testowej przy użyciu aplikatora.

- Dla próbek stałych – przy pomocy aplikatora pobrać próbkę kału nakładając ją w kilku miejscach i przenieść materiał w ilości ok. 50mg (1/4 wielkości ziarna groszku)
  - Dla próbek ciekłych – przy użyciu zakraplacza pobrać ok. 50µl próbki
- Zamknąć szczelnie próbkę testową, następnie wstrząsnąć próbką, w celu dobrego wymieszania próbki z buforem. Odczekać 3 minuty.

##### 3. Doprowadzić do temperatury pokojowej opakowanie z testem, wyjąć test i użyć tak szybko jak to możliwe.

4. Trzymając w pozycji pionowej próbkę testową odkręcić zatyczkę korka. Następnie przechylić próbkę i nakropić dwie krople (ok. 60 µl) badanej próbki na okienko testowe (S). Włączyć minutnik (15 min). Należy unikać tworzenia się pęcherzyków powietrza w okienku.

##### 5. Odczytać wynik po 15 minutach (od momentu naniesienia próbki). Nie odczytywać wyniku po upływie 20 min.

Uwaga: Jeśli próbka nie migruje wzdłuż paska (obecność cząstek stałych), należy rozcieńczyć próbkę odwirować. Następnie zebrać 80 µl supernatantu i wykonać test ponownie.

#### INTERPRETACJA WYNIKÓW

**Genogrupa 1 POZYTYWNY:** Dwie oddzielne kolorowe linie testowe. Jedna linia pojawia w rejonie kontrolnym (C), a druga w rejonie testowym genogrupy I (T1).

**Genogrupa 2 POZYTYWNY:** Dwie oddzielne kolorowe linie testowe. Jedna linia pojawia w rejonie kontrolnym (C), a druga w rejonie testowym genogrupy II (T2).

**Genogrupa 1 i Genogrupa 2 POZYTYWNE:** Trzy oddzielne kolorowe linie testowe. Jedna linia pojawia w rejonie kontrolnym (C), dwie w rejonach testowych genogrupy I i II (T1 i T2). Wynik pozytywny dla genogrupy I i II wskazuje, że antygeny obu genogrup zostały wykryte w próbce.

**\*Uwaga:** Intensywność barwy linii będzie zależała od stężenia antygenów norowirusa obecnych w próbce. Dlatego każdy odcień w rejonie (T) powinien być uważany za wynik pozytywny.

**NEGATYWNY:** Jedna kolorowa linia pojawia się w rejonie kontrolnym (C), brak linii w rejonie testowym (T1/T2).

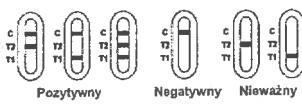
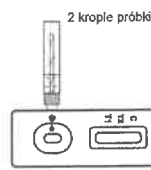
**WYNIK NIEWAŻNY:** zupełny brak linii lub brak linii kontrolnej wskazuje na błąd wykonania testu, nieprawidłowe działanie odczynników lub pogorszenie jakości paska testowego. W takim przypadku należy powtórzyć badanie z użyciem nowego testu.



3 minuty  
odstawić



2 krople próbki



Pozytywny

Negatywny

Nieważny

#### KONTROLA JAKOŚCI

Test zawiera pasek kontrolny (C), potwierdzający wystarczającą ilość próbki, umożliwiającą przesłanie membrany oraz prawidłową technikę wykonania. Zgodnie z GLP zaleca się używanie pozytywnych i negatywnych kontroli (nieodłącznych do testu) w celu potwierdzenia właściwego działania testu.

#### OGRAŃCZENIA TESTU

- Test powinien być wykorzystywany wyłącznie do wykrywania norowirusów w próbkach kału ludzkiego.
- Test wskazuje tylko na obecność antygenów norowirusa w próbce i nie powinien stanowić jedynego kryterium diagnostycznego.
- Próbki kału od niemowląt poniżej 1 roku życia mogą dawać fałszywie dodatnie wyniki.
- Uzyskane przy użyciu testu wyniki, powinny być porównane z wszystkimi dostępnymi klinicznymi i laboratoryjnymi danymi.
- Jeśli wynik testu jest negatywny, a symptomy nie ustępują, należy zastosować inne, dodatkowe metody diagnostyczne. Wynik negatywny nie wyklucza zakażenia norowirusem.

#### OCZEKIWANE WARTOŚCI

Test został porównany z wynikami otrzymanymi przy użyciu RT-PCR, wskazując na dokładność 94,3%.

#### CHARAKTERYSTYKA TESTU

##### Czułość/Specyficzność/Dokładność

Walidacji testu dokonano na podstawie 70 próbek pobranych od dzieci i młodzieży, porównano je z wynikami uzyskanymi przy użyciu RT-PCR. Wyniki wskazywały na względną wrażliwość 95,7%, oraz specyficzność 91,7%.

Metoda	RT-PCR		ogółem
	Wynik		
	Pozytywny	44	46
	Negatywny	2	24
ogółem		46	70

Względna Czułość: 95,7% (95%CI: 85,16%-99,57%)

Względna Specyficzność: 91,7% (95%CI: 73,00%-98,97%)

Względna Dokładność: 94,3% (95%CI: 86,01%-98,42%)

##### \*Przedział ufności

##### Powtarzalność wewnątrz serii

Precyzja w trakcie badań została określona przy użyciu 10 powtórzeń czterech próbek: negatywnej, słabo pozytywnej, średnio pozytywnej i wysoce pozytywnej. Probki zostały prawidłowo zidentyfikowane w > 99% przypadków.

##### Powtarzalność między seriami

Precyzję między seriami określono za pomocą 10 niezależnych testów na tych samych czterech próbkach: negatywnej, słabo pozytywnej, średnio pozytywnej i wysoce pozytywnej. Probki zostały prawidłowo zidentyfikowane w > 99% przypadków.

##### Interferencje

Sprawdzano reakcje krzyżowe i uznano je za ujemne dla poniższych mikroorganizmów przy mianie 1x10<sup>7</sup> ml przy użyciu testu.

<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>E. coli</i>

#### BIBLIOGRAFIA

- Shiota, T., Okame, M., Takanashi, S., Khamrin, P., Takagi, M., Satou, K., Masuoka, Y., Yagyu, F., Shimizu, Y., Kohno, H., Mizuguchi, M., Okitsu, S., Ushijima, H. (2007). Characterization of a Broadly Reactive Monoclonal Antibody against Norovirus Genogroups I and II: Recognition of a Novel Conformational Epitope. J. Virol. 81: 12298-12306
- Nguyen, T. A., Khamrin, P., Takanashi, S., Le Hoang, P., Pham, L. D., Hoang, K. T., Satou, K., Masuoka, Y., Okitsu, S., Ushijima, H. (2007). Evaluation of Immunochromatography Tests for Detection of Rotavirus and Norovirus among Vietnamese Children with Acute Gastroenteritis and the Emergence of a Novel Norovirus GII.4 Variant. J Trop Pediatr 53: 264-269
- M Okame, T Shiota, G Hansman, M Takagi, F Yagyu, S Takanashi, TG Phan, Y Shimizu, H Kohno, S Okitsu, H Ushijima (2007). Anti-norovirus polyclonal antibody and its potential for development of an antigen-ELISA. J Med Virol (2007) 79: 1180-6.
- Tracy Dewese Parker & al., Identification of genogroup I and genogroup II broadly reactive epitopes on the norovirus capsid, Journal of Virology, June 2005: 7402-7409.

	Uwaga, należy zapoznać się z dołączoną instrukcją		Liczba testów w zestawie		Autoryzowany Przedstawiciel na terenie Wspólnoty Europejskiej
	Produkt medyczny do diagnostyki in vitro		Termin przydatności do użycia		Wyrób jednorazowego użytku
	Przechowywać w temperaturze 2-30°C		Kod partii		Numer katalogowy
	Nie używać jeśli opakowanie jest uszkodzone		Wytwórca		Do wyrobu dołączona instrukcja

