



EIA for the detection of Rotavirus Antigen in Human Fecal Samples

REF 696004

IVD

Rx Only

INTENDED USE

Premier Rotaclone is an Enzyme Immunoassay (EIA) intended for the detection of rotavirus antigen in human fecal specimens.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Rotaviruses are the most important cause of early childhood non-bacterial gastroenteritis,¹⁻⁵ with the illness also being observed in older children and adults.⁶⁻⁸ Rotaviral gastroenteritis may result in mortality for populations at risk such as infants, the elderly, and immunocompromised patients.⁶⁻⁹ Nosocomial transmission of rotavirus is often a costly and difficult problem to resolve; therefore, the use of the monoclonal antibody based Premier Rotaclone test, which provides rapid accurate detection of rotavirus antigens, may lead to better patient management.

Transmission electron microscopy (EM) was the method initially used to detect virus in fecal and intestinal biopsy samples, and remains the standard to which rotavirus diagnostic tests are compared.^{1, 2} Rotaviruses are generally very difficult to detect *in vitro*; therefore, cell culture is not routinely used for detection and diagnosis.^{1, 2} The enzyme immunoassay (EIA) is a simple, highly sensitive method for the detection of rotavirus antigen, and is well suited for analysis of large numbers of samples.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

Premier Rotaclone utilizes monoclonal antibodies in a solid phase sandwich type EIA. Plastic microtiter wells are coated with a monoclonal antibody directed against the product of the sixth viral gene (VP6), which is the group specific antigen for all known human rotaviruses.^{1,2} An aliquot of fecal suspension is added to the well and incubated simultaneously with an anti-rotavirus monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase, resulting in the rotavirus antigen being sandwiched between the solid phase and enzyme-linked antibodies. After 60 minutes incubation at room temperature, the sample well is washed in order to remove unbound enzyme labeled antibodies. Enzyme substrate A (urea peroxide) and substrate B (TMB) are added to the wells and incubated for 10 minutes at room temperature. The enzyme bound in the wells converts the colorless substrate to a blue color. The intensity of the blue color is directly proportional to the concentration of rotavirus antigen in the sample.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.

1. Monoclonal Antibody coated microtiter wells
2. Premier Rotaclone Conjugate: Horseradish peroxidase conjugated to anti-rotavirus monoclonal antibody in a buffered protein solution with gentamicin and 0.02% thimerosal as preservatives
3. Positive Control: Inactivated simian rotavirus SA-11 in buffered saline with 0.02% thimerosal as a preservative
4. Sample Diluent: Buffered saline with 0.02% thimerosal as preservative
5. Part A Substrate Buffer: Contains urea peroxide
6. Part B Substrate Solution: Contains tetramethylbenzidine (TMB)
7. Stop Solution: Contains 1N H₂SO₄
8. Transfer pipettes
9. Microtiter well holder

MATERIALS NOT PROVIDED

1. 12 x 75 mm test tubes, test tube rack
2. Deionized or distilled water
3. Absorbent paper
4. Precision micropipette tips to deliver 100 µL and 1000 µL (optional)
5. Waste container with a 1:10 dilution of household bleach. For autoclaving, use an iodophor disinfectant.
6. Microwell plate reader capable of reading absorbance at 450 nm (optional).
7. Device for dispensing wash solution such as multi-channel pipette, syringe with manifold, wash bottle, etc.
8. Timer (minimum 1 hour)

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Do not mouth pipette samples or reagents. Avoid contact with broken skin or mucous membranes.
3. Do not smoke, eat or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. Wear disposable gloves while handling samples and wash hands after assay is complete. Patient specimens, assay controls and all materials coming into contact with them should be handled at Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/NIH manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories".
5. Avoid skin contact with stop solution (1N sulfuric acid). It may cause irritation and burns. Flush with water if contact occurs.
6. Dispose of all materials used to perform the test by autoclaving at 121 C for at least one hour. Liquid waste may be disposed by mixing with a 1:10 dilution of household bleach for a minimum of 30 minutes. **CAUTION:** Liquid waste containing stop solution must be neutralized before addition of household bleach.
7. Avoid splashing or generation of aerosols.
8. Do not use Premier Rotaclone reagents beyond the kit expiration date. Each reagent has been optimized for maximum performance. Dilution or adulteration of these reagents may result in a loss of sensitivity. Incubation time and temperatures other than those specified may give erroneous results.
9. Do not interchange or mix different lots of Premier Rotaclone reagents.
10. Avoid microbial contamination of reagents or incorrect results may occur. Contamination of samples could cause erroneous results.
11. Use separate pipettes or pipette tips for each sample, control and reagent.
12. DO NOT REUSE MICROWELLS.

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

 Premier Stop Solution	Signal Word Danger Hazard Statements H330 - Fatal if inhaled Contains Sulfuric acid Precautionary Statements - EU (§28, 1272/2008) P310 - Immediately call a POISON CENTER or doctor/ physician P304 + P340 - IF INHALED: Remove to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing P260 - Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapors/spray P403 + P233 - Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed
  Premier Substrate B	Signal Word Danger Hazard Statements H301 - Toxic if swallowed H311 - Toxic in contact with skin H330 - Fatal if inhaled H370 - Causes damage to organs Contains Methyl alcohol Precautionary Statements - EU (§28, 1272/2008) P301 + P310 - IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/ physician P280 - Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection P310 - Immediately call a POISON CENTER or doctor/ physician P304 + P340 - IF INHALED: Remove to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing P403 + P233 - Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed P307 + P311 - IF exposed: Call a POISON CENTER or doctor/ physician P260 - Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapors/spray P309 - IF exposed or if you feel unwell: P370 + P378 - In case of fire: Use dry sand, dry chemical or alcohol-resistant foam for extinction P210 - Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. - No smoking

SHELF LIFE AND STORAGE

Store kit reagents at 2-8 C. Bring kit reagents to room temperature before use and promptly return to 2-8 C after use. Return all unused microtiter wells to their original foil pouch.

INDICATION OF INSTABILITY OR DETERIORATION

The following conditions may indicate reagent deterioration:

- Any evidence of microbial contamination or heavy precipitation.
- Any blue color in the substrate solutions before addition to microwells.
- A negative control value greater than 0.150 absorbance units at 450 nm may indicate deterioration of reagents.
- A positive control value of less than 0.3 absorbance units may indicate deterioration of reagents.

If any of the above conditions are observed, contact our Technical Support Center at 1-800-343-3858.

REAGENT PREPARATION

- Bring all reagents to room temperature (20-30 C) before use.
- Return all reagents to 2-8 C immediately after use.
- Do not allow wells to dry between steps.
- Prepare decontaminating vessel for discarding reagents and materials.
- Reproducibility in any EIA assay is largely dependent upon the consistency with which the microwells are washed. Carefully follow the recommended washing sequence as outlined in the EIA test procedure.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool specimens should be collected as soon after onset of symptoms as possible. Peak viral counts are reported to occur on days 3-5 after onset of symptoms. Samples collected eight days or more after onset of symptoms may not contain enough rotavirus antigen to produce a positive reaction. Do not collect specimens in containers having media, preservatives, animal serum or detergent, as any of these may interfere with the Premier Rotaclone assay.

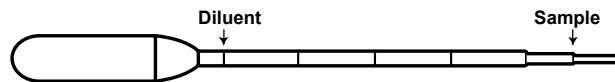
Diluted samples may be stored at 2-8 C for three days without interference with the assay performance. For long term storage of undiluted specimens, -20 C or colder is recommended. Repeated freezing and thawing of samples is not recommended and may cause erroneous results. Do not store in self-defrosting freezers.

SPECIMEN PREPARATION

Add 1 mL of sample diluent to properly marked tube, using a transfer pipette or precision pipette. Add samples by one of the following:

- Solid stool – press sample into transfer pipette to first mark.
- Liquid stool – aspirate sample into transfer pipette to first mark.
- Rectal swab – swirl swab in one ml of sample diluent to release fecal material. Firmly press swab against side of tube to remove liquid. Mix thoroughly. *Do not dilute further.*

Resuspend sample in 1 mL of Sample Diluent.



TEST PROCEDURE

- Snap off sufficient number of wells for samples and the controls and insert into the microtiter well holder. Record sample position.
- Add 2 drops (100 µL) each of diluted fecal sample, positive control and negative control (sample diluent) to the bottom of separate wells.
- Add 2 drops (100 µL) of enzyme conjugate to each well. Mix by gently swirling on tabletop.
- Incubate at room temperature for 60 ± 5 minutes.
- Pour the liquid out of the wells into a discard vessel. Tap the microtiter well holder upside down vigorously against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells.
- Fill all the wells to overflowing with deionized water and pour the liquid out as in Step 5.
- Repeat the washing procedure (Steps 5 & 6) four more times (for a total of 5 washes).
- Add 2 drops (100 µL) of substrate A solution to each well.
- Add 2 drops (100 µL) of substrate B solution to each well.
- Incubate 10 minutes at room temperature.

Visual determinations can be made after 10 minutes incubation in step 10. Samples with blue color greater than the negative control are positive. Samples showing equal or less color than the negative control are negative.

OPTIONAL – Spectrophotometric Procedure

Spectrophotometric determinations can be made by adding 2 drops (100 µL) of Stop Solution (sulfuric acid) to each well after the incubation in Step 10. Read the absorbance of each well at 450 nm using a > 600 nm reference filter (optional) against an air blank within 60 minutes.

INTERPRETATION OF RESULTS

- Positive Results by Visual Determination.** Any sample with blue color more intense than that of the negative is considered positive. Any sample with color equal to or less intense than the negative control is considered negative.
- Positive Results by Spectrophotometric Determination.** Specimens with absorbance units (A_{450}) greater than 0.150 are considered positive. Specimens with absorbance equal to or less than 0.150 are considered negative. Occasionally, a discrepancy may occur between visual and spectrophotometric determinations with samples containing low amounts of antigen. Spectrophotometric determination, being an objective method, is slightly more accurate.

NOTE: A precipitate may form in high positive samples. This will not affect the results.

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

Premier Rotaclone contains a Positive Control and a Negative Control (Sample Diluent) which should be run with each assay to ensure that kit reagents are functioning correctly and that proper assay procedures have been followed. If a visual evaluation is performed, the positive control should be deep blue and easily distinguished from the negative control. The negative control should be colorless or faint blue. If spectrophotometric determination is used, remove all bubbles and check the optical surface for spots or condensation; wipe with soft tissue if necessary. If the absorbance of the positive control does not equal or exceed 0.3 absorbance units, the assay is considered invalid and should be repeated. If the expected control reactions are not observed, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.

EXPECTED VALUES

Rotavirus infection is seasonal and is the most frequent cause of gastroenteritis in children six months to three years of age. Among children hospitalized for gastroenteritis, it can be expected that up to 50% of the patient specimens will give positive rotavirus test results.¹² The rate of positive test results may vary due to age, weather, seasonal factors, geographic location, and the general health environment for the group under study.¹³

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Premier Rotaclone is highly specific and sensitive for rotavirus antigen. This does not preclude the presence of other pathogenic organisms. While the relationship between rotavirus and gastroenteritis is well established, co-infection with bacterial pathogens is possible. Bacterial testing should be performed in parallel with Premier Rotaclone to rule out bacterial etiology of the illness.

Clinical testing of neonatal stools with Premier Rotaclone indicates good specificity and the absence of false positives;¹³ however, the results must be interpreted with caution. A negative result does not exclude the possibility of rotavirus infection, as too small a quantity of virus or inadequate or improper sampling may cause a false negative result.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Premier Rotaclone was tested in collaboration with two independent laboratories in the northeastern and southwestern USA on a total of 121 stools from children with gastroenteritis and compared with results obtained by EM. Discrepant results were resolved by use of a confirmatory blocking EIA.¹⁴ RNA analysis or serology. Results are shown in Table 1.

Table 1.

Premier Rotaclone		EM		EM/RNA		Kallestad	
		+	-	+	-	+	-
		36	3	38	1	29	0
	-	0	35	0	35	7	49
Sensitivity		100%		100%		81%	
Specificity		92%		97%		100%	
Agreement		96%		99%		92%	

LIMITS OF DETECTION

Serial dilutions of human rotavirus of a known particle count determined by EM were tested by Premier Rotaclone. The results are shown in Table 2.

Table 2.

EM	Premier Rotaclone
(Particles/mL)	(A_{450})
1.1×10^9	> 2.40
3.7×10^8	> 2.40
1.2×10^8	> 2.40
4.1×10^7	> 2.40
1.4×10^7	> 2.40
4.5×10^6	2.40
1.5×10^6	.60
5.0×10^5	.19
1.7×10^5	.09

A stool sample containing 3.3×10^{10} rotavirus particles/mL was serially diluted with a sample diluent.

* Sensitivity limits

REPRODUCIBILITY

1. Intra-Assay Variation

Three different concentrations of SA-11 rotavirus samples were assayed 21 times in duplicate (n=21). The results were as follows:

Intra-Assay Variation	Sample 1 (Negative)	Sample II (Low Pos)	Sample III (High Pos)
Mean Absorbance	0.059	0.184	0.561
Standard deviation	0.007	0.011	0.045
C.V. (%)	11.9	5.9	8.0

2. Inter-Assay Variation

Three different concentrations of SA-11 rotavirus samples were assayed 23 times using the same kit lot. The results were as follows:

Inter-Assay Variation	Sample 1 (Negative)	Sample II (Low Pos)	Sample III (High Pos)
Mean Absorbance	0.073	0.204	0.933
Standard deviation	0.008	0.023	0.100
C.V. (%)	12.3	11.4	10.7

CROSSREACTIVITY

Common intestinal pathogens and other organisms occasionally present in feces were tested by Premier Rotaclone. Suspensions containing 10^7 to 10^9 organisms were prepared in normal stool extracts with and without rotavirus. Results are shown in Table 3. A similar experiment was performed with a variety of viruses. These results are shown in Table 4.

Table 3. Crossreactivity Study

	A₄₅₀*	A₄₅₀**
Microorganisms Tested	Organism Alone	Organism & Virus
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.08	0.81
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.06	0.66
<i>Staph. aureus</i> (Cowan's)	0.05	0.71
<i>Candida albicans</i>	0.06	0.71
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.06	0.69
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.06	0.72
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.05	0.74
<i>Proteus mirabilis</i>	0.06	0.77
<i>Serratia marcescens</i>	0.07	0.72
<i>Escherichia coli</i>	0.07	0.81
Rotavirus neg stool	0.08	—
Rotavirus pos stool	—	0.78

Table 4.

	A₄₅₀*	A₄₅₀**
Virus Tested	Organism Alone	Organism & Virus
Echo 22	0.02	1.06
Echo 32	0.02	1.01
Coxsackie A-9	0.02	1.11
Coxsackie B-1	0.02	1.01
Coxsackie B-6	0.02	1.00
Adeno 2	0.02	1.05
Adeno 40	0.02	1.05
Adeno 41	0.02	1.06
Rotavirus neg stool	0.02	—
Rotavirus pos stool	—	1.07

* Rotavirus negative 10% stool suspension used as diluent.

** Rotavirus positive 10% stool suspension used as diluent.



Test immunoenzimatico (EIA) per la ricerca dell'antigene di Rotavirus in campioni fecali

REF 696004

IVD

Rx Only

FINALITÀ D'USO

Premier Rotaclone EIA è un test immunoenzimatico (EIA) per la ricerca dell'antigene di Rotavirus in campioni fecali.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

I Rotavirus rappresentano la principale causa di gastroenterite non batterica durante la prima infanzia,¹⁻⁵ ma possono anche causare la malattia in bambini più grandi e negli adulti.⁶⁻⁸

La gastroenterite da Rotavirus può essere causa di morte in gruppi a rischio quali bambini, anziani, e pazienti immuno-depressi.⁶⁻⁹ La trasmissione ospedaliera di Rotavirus è spesso un problema difficile da risolvere anche dal punto di vista economico quindi, il test Rotaclone, basato sull'utilizzo di anticorpi monoclonali, consente una rapida e accurata identificazione dell'antigene virale permettendo un più adeguato trattamento del paziente. La microscopia elettronica a trasmissione (EM) era il metodo inizialmente usato per identificare il virus nelle feci e nelle biopsie intestinali e attualmente rimane una metodica standard di confronto per gli altri test di identificazione di Rotavirus.

I Rotavirus generalmente sono molto difficili da identificare in vitro, per questo motivo le colture cellulari non vengono utilizzate come ordinaria procedura di identificazione del virus.^{1,2} Il sistema immunoenzimatico (EIA) è un metodo semplice e altamente sensibile per l'identificazione dell'antigene di Rotavirus ed è adatto per l'analisi di un largo numero di campioni.

PRINCIPI BIOLOGICI

Il test Premier Rotaclone EIA utilizza anticorpi monoclonali adsorbiti su pozzetti microtiter, diretti contro il prodotto del sesto gene virale (VP6) che rappresenta l'antigene specifico di tutti i Rotavirus umani conosciuti.¹² Un'aliquota della sospensione di campione fecale viene aggiunta al pozzetto e incubata contemporaneamente con un anticorpo monoclonale anti-rotavirus, coniugato con perossidasi di rafano. Se l'antigene è presente si formerà un complesso anticorpo di cattura-antigene-coniugato. Dopo 60 minuti di incubazione a temperatura ambiente i pozzetti vengono lavati per allontanare l'eccesso di coniugato. Quindi si aggiungono il substrato (perossido di urea) e una sostanza cromogena (TMB), lasciando in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente. In presenza di coniugato enzimatico legato all'antigene si avrà uno sviluppo di colore blu. L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla concentrazione di antigene nel campione.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

1. Pozzetti microtiter adsorbiti con anticorpo monoclonale anti-Rotavirus
2. Coniugato enzimatico – Anticorpo monoclonale specifico anti-Rotavirus, marcato con perossidasi di rafano, in soluzione proteica contenente gentamicina e 0,02% thimerosal come conservante
3. Controllo Positivo – Rotavirus SA-11 da scimmia, inattivato, in soluzione tampone, contenente 0,02% thimerosal come conservante
4. Diluente campione – Soluzione tampone contenente 0,02% thimerosal come conservante
5. Substrato A – Soluzione tampone contenente perossido di urea
6. Substrato B – Soluzione cromogena contenente tetrametilbenzidina (TMB)
7. Soluzione di arresto – Acido solforico 1N
8. Pipette monouso
9. Supporto per pozzetti microtiter

MATERIALI NON FORNITI

1. Provette (12 x 75 mm) per allestire le diluizioni dei campioni, rack per provette
2. Acqua distillata o deionizzata
3. Carta assorbente
4. OPZIONALI: pipettatrici e puntali in grado di erogare da 100 µL a 1000 µL
5. Contenitore per il materiale di scarico dei lavaggi contenente una soluzione di candeggina al 10%
6. OPZIONALE: Lettore EIA per micropiastre dotato di filtri per la lettura a 450 nm
7. Spruzzetta-o-pipetta multicanale per dispensare la soluzione di lavaggio
8. Timer

PRECAUZIONI

1. **Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.**
2. Non pipettare nessun campione o reagente con la bocca.
3. Non fumare, mangiare o bere nelle aree dove i campioni e i reagenti del kit vengono utilizzati.
4. Indossare guanti monouso e lavare le mani dopo l'esecuzione del test. I campioni dei pazienti e i controlli possono contenere agenti infettivi e devono pertanto essere maneggiati ed eliminati come materiali potenzialmente pericolosi.
5. Evitare che la soluzione d'arresto (acido solforico) venga a contatto con la pelle. Può causare irritazioni e bruciature.
6. Autoclavare i materiali utilizzati per il test a 121 C per almeno un'ora prima di eliminarli. Al liquido di scarico deve essere aggiunta una soluzione di candeggina al 10% per almeno 30 minuti. **ATTENZIONE:** Il liquido di scarico contenente la Soluzione di arresto deve essere neutralizzato prima dell'aggiunta di ipoclorito di sodio.
7. Evitare la fuoriuscita dei reagenti dai pozzetti e la formazione di aerosol.
8. Non utilizzare reagenti scaduti. Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli indicati possono causare risultati non corretti.
9. Non scambiare o mescolare reagenti appartenenti a lotti differenti.
10. La contaminazione microbica dei reagenti può causare risultati non corretti.
11. Usare pipette o puntali diversi per ogni campione, controllo e reagente.
12. Non riutilizzare i pozzetti.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

 Premier Stop Solution	avvertenza Pericolo indicazioni di pericolo H330 - Letale se inalato Contiene Sulfuric acid Consigli di Prudenza - UE (§28, 1272/2008) P310 - Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico P304 + P340 - IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione P260 - Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol P403 + P233 - Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato
 Premier Substrate B	avvertenza Pericolo indicazioni di pericolo H301 - Tossico se ingerito H311 - Tossico per contatto con la pelle H330 - Letale se inalato H370 - Provoca danni agli organi Contiene Methyl alcohol Consigli di Prudenza - UE (§28, 1272/2008) P301 + P310 - IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico P280 - Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso. P310 - Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico P304 + P340 - IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione P403 + P233 - Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato P307 + P311 - IN CASO di esposizione, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico P260 - Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol P309 - IN CASO di esposizione o di malessere: P370 + P378 - In caso di incendio: estinguere con sabbia secca, prodotto chimico secco o schiuma resistente all'alcol P210 - Tenere lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici riscaldate. - Non fumare

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è indicata sull'etichetta esterna. Conservare il kit a 2-8 C e rimetterlo in frigorifero immediatamente dopo l'utilizzo. Riporre tutti i pozzetti non usati nella loro busta.

INSTABILITÀ E DETERIORAMENTO

Le seguenti condizioni possono indicare un deterioramento dei reagenti:

1. Evidente contaminazione microbica dei reagenti o formazione di precipitato.
2. Substrato di colore blu prima dell'aggiunta ai pozzetti.
3. Un controllo negativo con un valore di assorbanza maggiore di 0,150 a 450 nm può indicare un deterioramento dei reagenti.
4. Un controllo positivo con un valore di assorbanza minore di 0,3 può indicare un deterioramento dei reagenti.

Se le condizioni elencate sopra dovessero verificarsi contattare il Servizio Tecnico o il Distributore Locale, (Italia +390331433636).

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

1. Lasciare che tutti i componenti del kit, busta dei micropozzetti inclusa, raggiungano temperatura ambiente (20-30 C) prima di iniziare il test.
2. Riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8 C dopo l'uso.
3. Fare in modo che i pozzetti non si asciughino completamente durante i diversi passaggi del test.
4. Preparare dei recipienti decontaminati per lo scarico di reagenti e materiali.
5. La riproducibilità dei risultati è strettamente dipendente dalla modalità con cui è stato eseguito il lavaggio dei pozzetti. E' importante eseguire correttamente la procedura di lavaggio, come indicato nella sezione PROCEDURA DEL TEST.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni di feci dovrebbero essere raccolti appena dopo la comparsa dei sintomi. La fase acuta dell'infezione avviene 3-5 giorni dopo la comparsa dei primi sintomi. I campioni raccolti dopo più di otto giorni dalla comparsa dei primi sintomi potrebbero non contenere una quantità di antigene virale tale da produrre una reazione positiva. Non raccogliere i campioni in contenitori contenenti terreni, conservanti, siero animale o detergenti, dal momento che queste sostanze potrebbero interferire con l'esecuzione del test Premier Rotaclone.

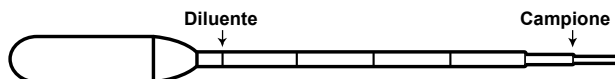
I campioni diluiti devono essere esaminati il più velocemente possibile, ma possono anche essere conservati fino a tre giorni in frigorifero (2-8 C). Se la ricerca non può essere effettuata entro questo lasso di tempo, i campioni non diluiti dovrebbero essere congelati in un congelatore senza sbrinamento ciclico ad una temperatura di -20 C (o inferiore) al momento dell'arrivo in laboratorio. Ripetuti cicli di congelamento e scongelamento sono sconsigliati perchè potrebbero dare risultati scorretti.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Distribuire 1 mL di Diluente del campione nelle provette opportunamente contrassegnate. Aggiungere i campioni nel seguente modo:

1. Feci solide: far entrare il campione nella pipetta fino alla prima tacca.
2. Feci liquide: aspirare il campione nella pipetta fino alla prima tacca.
3. Tampone rettale: stemperare il tampone in 1 mL di Diluente del campione, perchè rilasci il materiale fecale. Premere il tampone contro la parete della provetta per rimuovere il liquido, quindi mescolare bene. Non diluire ulteriormente.

Risospendere il campione in 1 mL di Diluente del campione.



PROCEDURA DEL TEST

- 1. Preparare un numero di pozzetti sufficiente per i campione e per due controlli. Inserire i pozzetti nel supporto e segnare la posizione dei singoli campioni.
- 2. Aggiungere 2 gocce (100 µL) di campione diluito, controllo positivo, controllo negativo (diluente del campione) in pozzetti separati.
- 3. Aggiungere 2 gocce (100 µL) di Coniugato enzimatico ad ogni pozzetto. Mescolare bene, agitando delicatamente la piastra.
- 4. Incubare a temperatura ambiente per 60 ± 5 minuti.
- 5. Scartare il contenuto dei pozzetti in un contenitore con disinfettante. Scuotere la piastra su carta assorbente pulita per rimuovere completamente il liquido dai pozzetti.
- 6. Riempire i pozzetti con acqua distillata e scartare il liquido come al punto 5.
- 7. Ripetere questa operazione di lavaggio (punto 5 e 6) per piu' volte (per un totale di 5 lavaggi).
- 8. Distribuire 2 gocce (100 µL) di Substrato A in ciascun pozzetto.
- 9. Distribuire 2 gocce (100 µL) di Substrato B in ciascun pozzetto.
- 10. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.

Al termine dell'incubazione (punto 10) può venire eseguita una lettura visiva: i campioni di colore blu, piu' intenso, rispetto al controllo negativo sono positivi. I campioni che invece hanno un colore uguale o meno intenso rispetto al controllo negativo, sono negativi.

OPZIONALE – Lettura Spettrofotometrica

Al termine dell'ultima incubazione può essere eseguita una lettura spettrofotometrica, dopo aggiunta di 2 gocce (100 µL) di Soluzione d'arresto (acido solforico). L'assorbanza di ogni pozzetto deve essere letta a 450 nm usando un filtro di riferimento > 600 nm (opzionale) entro 60 minuti, dopo avere azzerato contro aria.

INTERPRETAZIONE DI RISULTATI

- 1. **Risultati positivi mediante lettura visiva.** Ogni campione con un colore blu piu' intenso di quello del controllo negativo è considerato positivo. Ogni campione con un colore uguale o meno intenso di quello del controllo negativo è considerato negativo.
- 2. **Risultati positivi mediante lettura spettrofotometrica.** I campioni con un'assorbanza (A₄₅₀) maggiore di 0,150 sono considerati positivi. I campioni con un'assorbanza uguale o minore di 0,150 sono considerati negativi. Occasionalmente si può verificare una discrepanza tra i risultati ottenuti con la lettura spettrofotometrica e quella visiva in quei campioni che hanno un basso contenuto di antigene. Per questo motivo la lettura spettrofotometrica, essendo oggettiva è piu' accurata.

NOTA: nei campioni molto positivi può formarsi un precipitato, questo fatto non altera i risultati.

CONTROLLO QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai compententi enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

Il Controllo Positivo e quello Negativo (Diluente del campione) devono essere inclusi ogni volta che si esegue il test per controllare il corretto funzionamento dei reagenti. Se si esegue una lettura visiva, il controllo positivo deve essere blu intenso e quindi facilmente distinguibile dal controllo negativo. Il controllo negativo deve essere incolore o debolmente blu. Se si esegue una lettura spettrofotometrica, assicurarsi che non ci siano bolle nei pozzetti e che sulla superficie ottica non ci siano macchie o condensa, se è necessario asciugare delicatamente.

Se l'assorbanza del controllo positivo non è uguale o maggiore a 0,3, il test non è considerato valido e deve essere ripetuto. Se non si ottengono i risultati attesi con i Controlli, come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Si il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributor Locale (in Italia +390331433636).

VALORI ATTESI

L'infezione da Rotavirus è stagionale ed è la causa piu' frequente di gastroenterite nei bambini dai sei mesi ai tre anni di età. Tra i bambini ricoverati in ospedale ci si aspetta di ottenere oltre il 50% di risultati positivi.¹² Il numero di risultati positivi può variare in funzione dell'età, di fattori stagionali, della località geografica e dello stato generale di salute del gruppo studiato.¹³

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Premier Rotacalone è un test altamente specifico e sensibile per l'antigene di Rotavirus. Questo non preclude la possibile presenza di altri organismi patogeni. Pur esistendo una relazione ben definita tra Rotavirus e gastroenterite sono anche possibili co-infezioni con batteri patogeni. Per questo motivo dovrebbero essere eseguiti in parallelo con il test Premier Rotacalone, test di identificazione batterica per escludere l'eventuale natura batterica dell'infezione.

I risultati ottenuti con il test Premier Rotacalone su campioni di feci di neonati indicano buona specificità e assenza di risultati falsi positivi,¹³ i risultati devono comunque essere interpretati con cautela, infatti un risultato negativo non esclude la possibilità di un'infezione da Rotavirus in quanto, basse quantità di virus o l'inadeguato campionamento e conservazione del campione possono dare risultati falsi negativi.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Premier Rotacalone è stato valutato presso due importanti laboratori ospedalieri negli Stati Uniti. Sono stati analizzati 121 campioni di feci ottenuti da bambini con gastroenterite mediante il test Premier Rotacalone e i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti mediante microscopia elettronica (EM). I campioni che hanno dato risultati contrastanti con le due diverse tecniche sono stati ritestati mediante un test di conferma blocking EIA,¹⁴ analisi dell'RNA o test sierologici.

Tabella 1. I risultati sono mostrati nella tabella 1

		EM		EM/RNA		Kallestad	
		+	-	+	-	+	-
Premier Rotacalone	+	36	3	38	1	29	0
	-	0	35	0	35	7	49
Sensibilità		100%		100%		81%	
Specificità		92%		97%		100%	
Concordanza		96%		99%		92%	

LIMITI DI IDENTIFICAZIONE

Diluizioni seriali di Rotavirus umano a concentrazione nota, determinata mediante EM sono state testate mediante il test Premier Rotacalone. I risultati sono mostrati in tabella 2.

Tabella 2. Limiti di identificazione del test Premier Rotacalone

ME	Premier Rotacalone
(Particelle virali/mL)	(A ₄₅₀)
1,1 x 10 ⁹	> 2,40
3,7 x 10 ⁸	> 2,40
1,2 x 10 ⁸	> 2,40
4,1 x 10 ⁷	> 2,40
1,4 x 10 ⁷	> 2,40
4,5 x 10 ⁶	2,40
1,5 x 10 ⁶	,60
*5,0 x 10 ⁵	,19
1,7 x 10 ⁵	,09

Su un campione di feci contenente 3,3 x 10¹⁰ particelle virali/mL sono state eseguite diluizioni seriali con Diluente del campione.

*Limite di sensibilità

RIPRODUCIBILITÀ

1. Variazione intra-saggio. Tre campioni contenenti tre diverse concentrazioni di Rotavirus SA-11 sono stati testati 21 volte in doppio (n=21). I risultati sono riportati di seguito:

Variazione intra-saggio	Campione I (Negativo)	Campione II (Basso positivo)	Campione III (Alto positivo)
Assorbanza media	0,059	0,184	0,561
Deviazione standard	0,007	0,011	0,045
C.V. (%)	11,9	5,9	8,0

2. Variazione inter-saggio. Tre campioni contenenti tre diverse concentrazioni di Rotavirus SA-11 sono stati testati 23 volte usando un kit dello stesso lotto. I risultati sono riportati di seguito:

Variazione inter-saggio	Campione I (Negativo)	Campione II (Basso positivo)	Campione III (Alto positivo)
Assorbanza media	0,073	0,204	0,933
Deviazione standard	0,008	0,023	0,100
C.V. (%)	12,3	11,4	10,7

CROSS-REATTIVITÀ

Mediante test Premier Rotacalone sono stati testati patogeni intestinali comuni e altri organismi presenti occasionalmente nelle feci. Sospensioni fecali contenenti da 10^7 a 10^9 organismi sono stati analizzati in presenza e in assenza di Rotavirus. I risultati sono mostrati in tabella 3. Un esperimento analogo è stato eseguito con diversi virus. Questi risultati sono mostrati in tabella 4.

Tabella 3. Studio sulle cross-reattività

	A ₄₅₀ *	A ₄₅₀ **
Microorganismo testato	Solo microorganismo	Organismo & Virus
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,08	0,81
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,06	0,66
<i>Staph. aureus</i> (Cowan's)	0,05	0,71
<i>Candida albicans</i>	0,06	0,71
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,06	0,69
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,06	0,72
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,05	0,74
<i>Proteus mirabilis</i>	0,06	0,77
<i>Serratia marcescens</i>	0,07	0,72
<i>Escherichia coli</i>	0,07	0,81
Rotavirus (campione negativo)	0,08	—
Rotavirus (campione positivo)	—	0,78

Tabella 4

	A ₄₅₀ *	A ₄₅₀ **
Virus testato	Solo microorganismo	Organismo & Virus
Echo 22	0,02	1,06
Echo 32	0,02	1,01
Coxsackie A-9	0,02	1,11
Coxsackie B-1	0,02	1,01
Coxsackie B-6	0,02	1,00
Adeno 2	0,02	1,05
Adeno 40	0,02	1,05
Adeno 41	0,02	1,06
Rotavirus (campione negativo)	0,02	—
Rotavirus (campione positivo)	—	1,07

*Sospensione fecale al 10% non contenente Rotavirus usata come diluente.

**Sospensione fecale al 10% contenente Rotavirus usata come diluente.



**Test ELISA pour la détection des antigènes de Rotavirus
dans les échantillons de selles humaines**

REF 696004

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Le Premier Rotaclone est un test immuno-enzymatique destiné à la détection des antigènes de Rotavirus dans les échantillons de selles humaines.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Les Rotavirus sont la cause la plus importante de gastro-entérites non bactériennes au cours de la petite enfance.¹⁻⁵ La maladie est aussi observée chez les enfants plus âgés et les adultes.⁶⁻⁸ Les gastro-entérites à Rotavirus peuvent entraîner une mortalité dans les populations à risque comme les enfants, les personnes âgées et les patients immunodéprimés.⁶⁻⁹ La transmission nosocomiale du Rotavirus est souvent un problème coûteux et difficile à résoudre. Ainsi le test Premier Rotaclone, basé sur des anticorps monoclonaux, qui permet une détection rapide et précise, conduit à une meilleure prise en charge des patients.

La microscopie électronique à transmission (ME) était la méthode utilisée initialement pour la détection du virus dans les échantillons de selles et les biopsies intestinales, et reste la technique standard à laquelle sont comparés les tests de diagnostic du Rotavirus.^{1,2} Les Rotavirus sont généralement très difficiles à détecter in vitro et la culture cellulaire n'est donc pas utilisée en routine pour la détection et le diagnostic.^{1,2} Le test ELISA est une méthode simple, très sensible pour la détection des antigènes de Rotavirus et est bien adaptée à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons.

PRINCIPE DU TEST

Le Premier Rotaclone utilise des anticorps monoclonaux fixés sur une phase solide dans un test ELISA de type sandwich. Les micropuits en plastique sont recouverts par un anticorps monoclonal dirigé contre le produit du 6^{ème} gène viral (VP6), l'antigène spécifique de groupe pour tous les Rotavirus humains connus.¹² Une fraction aliquote de suspension fécale est ajoutée aux puits et incubée simultanément avec un anticorps monoclonal anti-rotavirus conjugué à la peroxydase de Raifort. L'antigène de Rotavirus est ainsi pris en sandwich entre la phase solide et l'anticorps lié à l'enzyme. Après 60 minutes d'incubation à température ambiante, les puits d'échantillons sont lavés afin d'éliminer les anticorps marqués non liés. Le substrat enzymatique A (peroxyde d'urée) et le substrat B (TMB) sont ajoutés aux puits et incubés 10 minutes à température ambiante. L'enzyme liée dans les puits convertira le substrat incolore pour donner une coloration bleue. L'intensité de la coloration bleue est directement proportionnelle à la concentration en antigène de Rotavirus présent dans l'échantillon.

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

1. Micropuits recouverts d'anticorps monoclonaux anti-rotavirus
2. Conjugué Premier Rotaclone - Anticorps monoclonaux anti-rotavirus conjugués à la peroxydase de Raifort dans une solution protéique tamponnée avec de la gentamycine et 0,02% de thimérosal comme conservateurs
3. Contrôle positif - Rotavirus simien (SA-11) inactivé dans une solution saline tamponnée avec 0,02% de thimérosal comme conservateur
4. Diluant échantillons - Solution saline tamponnée avec 0,02% de thimérosal comme conservateur
5. Substrat A - Contient du peroxyde d'urée
6. Substrat B - Contient du tétraméthylbenzidine (TMB)
7. Solution d'arrêt - Contient de l'acide sulfurique 1N
8. Pipettes de transfert pour échantillons
9. Support de micropuits

MATERIEL NON FOURNI

1. Tubes à essai (12 x 75 mm), portoir de tubes
2. Eau distillée ou désionisée
3. Papier absorbant
4. Micropipette de précision pour délivrer des volumes de 100 µL et 1000 µL (optionnel)
5. Conteneur poubelle contenant de l'eau de Javel à la dilution 1:10. Pour l'autoclavage, utiliser un désinfectant iodophore.
6. Lecteur de microplaques capable de lire des absorbances à 450 nm (en option)
7. Dispositif pour distribuer la solution de lavage, type pipette multi-canaux, seringue avec distributeur automatique, pissette
8. Minuteur (1 heure minimum)

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Ne pas pipetter à la bouche les échantillons ou les réactifs. Eviter le contact avec des lésions de la peau ou des muqueuses.
3. Ne pas fumer, manger ou boire sur le lieu où sont manipulés les échantillons ou les réactifs du coffret.
4. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons et se laver les mains à la fin du test. Les échantillons de patients, les contrôles et tout matériel entrant en contact avec, doivent être manipulés avec précaution (Biosafety Level 2) comme recommandé dans le manuel CDC/NIH "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories".
5. Eviter le contact cutané avec la solution d'arrêt (acide sulfurique 1N), car cela peut provoquer des irritations et des brûlures. Rincer immédiatement à l'eau en cas de contact.
6. Tout le matériel utilisé pour réaliser le test doit être traité par autoclavage à 121 °C pendant au moins 1 heure. Les poubelles liquides doivent être mélangées à une solution au 1:10 d'eau de Javel pendant au moins 30 minutes. ATTENTION: la poubelle liquide contenant la solution stop doit être neutralisée avant le traitement à l'eau de Javel.
7. Eviter les projections et la formation d'aérosols.
8. Ne pas utiliser les réactifs du Premier Rotaclone au-delà de la date d'expiration du coffret. Chaque réactif a été optimisé pour une performance maximale. Toute dilution ou dénaturation de ces réactifs peut entraîner une perte de sensibilité. Des temps d'incubation ou des températures autres que ceux spécifiés peuvent entraîner des résultats erronés.
9. Ne pas intervenir ou mélanger des réactifs de différents lots de Premier Rotaclone.
10. Eviter les contaminations microbiennes des réactifs, qui peuvent conduire à des résultats incorrects.
11. Utiliser des pipettes ou des embouts de pipettes différents pour chaque échantillon, contrôle et réactif.
12. NE PAS REUTILISER LES MICROPUITS.

DANGER ET MISES EN GARDE

 Premier Stop Solution	mention d'avertissement Danger mentions de danger H330 - Mortel par inhalation Contient Sulfuric acid Conseils de prudence - UE (par 28, 1272/2008) P310 - Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin P304 + P340 - EN CAS D'INHALATION: transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer P260 - Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols P403 + P233 - Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche
 Premier Substrate B	mention d'avertissement Danger mentions de danger H301 - Toxique en cas d'ingestion H311 - Toxique par contact cutané H330 - Mortel par inhalation H370 - Risque avéré d'effets graves pour les organes Contient Methyl alcohol Conseils de prudence - UE (par 28, 1272/2008) P301 + P310 - EN CAS D'INGESTION: appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin P280 - Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage. P310 - Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin P304 + P340 - EN CAS D'INHALATION: transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer P403 + P233 - Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche P307 + P311 - EN CAS d'exposition: appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin P260 - Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols P309 - EN CAS d'exposition ou d'un malaise : P370 + P378 - En cas d'incendie : Utiliser du sable sec, un agent chimique sec ou de la mousse résistant à l'alcool pour l'extinction P210 - Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. - Ne pas fumer

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

Les réactifs du coffret doivent être conservés à 2-8 C. Ramener tous les composants du coffret à température ambiante (20-30 C) avant utilisation et remettre rapidement à 2-8 C après utilisation. Laisser les micropuits dans le sachet jusqu'à ce que le sachet ait atteint la température ambiante. Remettre tous les micropuits non utilisés dans le sachet d'origine. Les micropuits sont stables après ouverture, pour la durée de péremption du coffret.

INDICATION D'INSTABILITE OU DE DETERIORATION

Les conditions suivantes peuvent indiquer une détérioration des réactifs:

1. Toute évidence de contamination microbienne ou de précipitation.
2. Toute apparition d'une coloration bleue dans les solutions de substrat avant addition dans les micropuits.
3. Une valeur d'absorbance à 450 nm du contrôle négatif supérieure à 0,150 peut indiquer une détérioration des réactifs.
4. Une valeur d'absorbance à 450 nm du contrôle positif inférieure à 0,3 peut indiquer une détérioration des réactifs.

Si une de ces conditions est observée, contacter les services techniques de Meridian Bioscience ou votre distributeur local.

PREPARATION DES REACTIFS

1. Ramener tous les réactifs à température ambiante (20-30 C).
2. Remettre tous les réactifs à 2-8 C après utilisation.
3. Ne pas laisser sécher les micropuits entre deux étapes.
4. Préparer des conteneurs de décontamination pour l'élimination des réactifs et du matériel.
5. Pour tous les tests ELISA, la reproductibilité dépend largement du soin avec lequel les micropuits sont lavés. Suivre avec attention la séquence de lavage recommandée dans la procédure de test ELISA.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons de selles doivent être collectés dès que possible après l'apparition des symptômes. Il a été décrit que le pic viral se produit 3 à 5 jours après l'apparition des symptômes. Les échantillons collectés huit jours ou plus après l'apparition des symptômes peuvent ne pas contenir suffisamment d'antigènes de Rotavirus pour produire une réaction positive. Ne pas collecter les échantillons dans des conteneurs avec du milieu, des conservateurs, du sérum animal ou des détergents car cela pourrait interférer avec le test Premier Rotaclone.

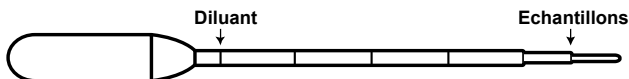
Les échantillons dilués peuvent être conservés à 2-8 C pendant trois jours sans que cela interfère avec les performances du test. Pour des temps de conservation plus longs, il est recommandé de conserver les échantillons non dilués à au moins -20 C. Des congélations/décongélations répétées des échantillons peuvent causer des résultats erronés et ne sont pas recommandées. Ne pas conserver dans des congélateurs auto-dégivrants.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

En utilisant une pipette de transfert ou une pipette de précision, ajouter 1 mL de diluant échantillons à un tube marqué de façon adéquate. Ajouter l'échantillon:

1. Selles solides: presser l'échantillon dans la pipette de transfert jusqu'à la première marque.
2. Selles liquides: aspirer l'échantillon dans la pipette de transfert jusqu'à la première marque.
3. Prélèvements rectaux: faire tourner le prélèvement dans 1 mL de diluant échantillons afin de relâcher le matériel fécal. Presser fermement le prélèvement sur le bord du tube pour éliminer le liquide. Mélanger. *Ne pas diluer davantage.*

Resuspendre l'échantillon avec 1 mL de diluant échantillons.



PROCEDURE DE TEST

- 1. Détacher un nombre suffisant de puits pour les échantillons et les contrôles et les placer sur le support de micropuits. Noter la position des échantillons.
 - 2. Ajouter 2 gouttes (100 µL) d'échantillon fécal dilué, de contrôle négatif (diluant échantillons) ou de contrôle positif dans le fond de micropuits séparés.
 - 3. Ajouter 2 gouttes (100 µL) de conjugué enzymatique à chaque micropuits. Mélanger par rotation.
 - 4. Incuber 60 ± 5 minutes à température ambiante.
 - 5. Eliminer le liquide des puits dans un conteneur poubelle. Taper fermement le support de micropuits sur un papier absorbant afin d'éliminer complètement le liquide des micropuits.
 - 6. Remplir entièrement tous les puits d'eau désionisée et éliminer le liquide comme dans l'étape 5.
 - 7. Répéter la procédure de lavage (étapes 5 et 6) quatre fois supplémentaires pour un total de 5 lavages.
 - 8. Ajouter 2 gouttes (100 µL) de solution Substrat A (peroxyde d'urée) à chaque micropuits.
 - 9. Ajouter 2 gouttes (100 µL) de solution Substrat B (TMB) à chaque micropuits.
 - 10. Incuber 10 minutes à température ambiante.
- Une détermination visuelle peut être effectuée après l'incubation de 10 minutes de l'étape 10. Les échantillons avec une couleur bleue plus marquée que le contrôle négatif sont positifs. Les échantillons montrant la même couleur ou une coloration plus pâle que le contrôle négatif sont négatifs.

PROCEDURE SPECTROPHOTOMETRIQUE (OPTIONNELLE)

Des déterminations spectrophotométriques peuvent être réalisées en ajoutant 2 gouttes (100 µL) de solution d'arrêt (acide sulfurique 1N) à chaque micropuits après l'incubation de l'étape 10. Lire l'absorbance de chaque micropuits à 450 nm en utilisant un filtre de référence > 600 nm (optionnel). Faire le blanc sur l'air et lire dans les 60 minutes.

INTERPRETATION DES RESULTATS

- 1. **Résultats positifs par détermination visuelle.** Tout échantillon avec une coloration plus intense que le contrôle négatif est considéré comme positif. Tout échantillon avec une coloration égale ou moins intense que le contrôle négatif est considéré comme négatif.
 - 2. **Résultats positifs par détermination spectrophotométrique.** Les échantillons avec une absorbance (DO₄₅₀) supérieure à 0,150 sont considérés comme positifs. Les échantillons avec une absorbance égale ou inférieure à 0,150 sont considérés comme négatifs. Occasionnellement, une discordance peut être observée entre la lecture visuelle et spectrophotométrique, avec des échantillons contenant de faible quantité d'antigène. La détermination spectrophotométrique, plus objective, est légèrement plus précise.
- Remarque: un précipité peut se former dans les échantillons fortement positifs. Ceci n'affectera pas les résultats du test.

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

Le Premier Rotaclone est fourni avec des contrôles positif et négatif (diluant échantillons) qui doivent être utilisés lors de chaque test afin de garantir la qualité des réactifs ainsi qu'une procédure de test correcte. Si une évaluation visuelle est réalisée, le contrôle positif doit être bleu foncé et doit être clairement distingué du contrôle négatif. Le contrôle négatif doit être incolore ou bleu très pâle. Si une détermination spectrophotométrique est réalisée, éliminer les bulles et vérifier l'absence de tache ou de condensation sur la surface optique. Essuyer avec un tissu non pelucheux si nécessaire. Si l'absorbance du contrôle positif n'est pas supérieure ou égale à 0,3, l'essai est considéré comme non valide et doit être répété. Si les réactions attendues ne sont pas observées, la première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.

VALEURS ATTENDUES

Les infections à Rotavirus sont saisonnières et sont la cause la plus fréquente de gastro-entérites chez les enfants âgés de six mois à trois ans. Parmi les enfants hospitalisés pour des gastro-entérites, on peut s'attendre à ce que plus de 50% des échantillons de patients donnent un résultat positif pour le Rotavirus.¹² Le taux de positivité peut varier en fonction de l'âge, du temps, de facteurs saisonniers, de la localisation géographique et de l'environnement sanitaire général de la population étudiée.¹³

LIMITES DU TEST

Le Premier Rotaclone est un test hautement sensible et spécifique pour la détection des antigènes de Rotavirus. Ceci n'exclut pas la présence d'autres organismes pathogènes. Bien que la relation entre le Rotavirus et les gastro-entérites soit bien établie, une co-infection par d'autres pathogènes bactériens est possible. Des tests bactériens doivent être réalisés en parallèle avec le Premier Rotaclone afin d'exclure une étiologie bactérienne de la maladie.

Des tests cliniques sur des échantillons néonataux avec le Premier Rotaclone indiquent une bonne spécificité et l'absence de résultats faussement positifs.¹³ Cependant, les résultats doivent être interprétés avec prudence. Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection par le Rotavirus, dans la mesure où une quantité de virus trop faible, ou un échantillonnage inadéquat ou incorrect peuvent causer des résultats faussement négatifs.

PERFORMANCES DU TEST

Le Premier Rotaclone a été testé en collaboration avec des laboratoires indépendants du Nord-est et du Sud-ouest des USA, sur un total de 121 échantillons de selles provenant d'enfants atteints de gastro-entérites, et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus par ME. Les résultats discordants ont été résolus en utilisant un test ELISA de confirmation,¹⁴ l'analyse de l'ARN ou la sérologie. Les résultats sont donnés dans le tableau 1.

Tableau 1.

		EM		EM/RNA		Kallestad	
		+	-	+	-	+	-
Premier Rotaclone	+	36	3	38	1	29	0
	-	0	35	0	35	7	49
Sensibilité		100%		100%		81%	
Spécificité		92%		97%		100%	
Corrélation		96%		99%		92%	

LIMITES DE DETECTION

Des dilutions sérielles de Rotavirus humain à partir d'un comptage connu de particules par ME, ont été testées par le Premier Rotaclone. Les résultats sont donnés dans le tableau 2.

Tableau 2.

ME	Premier Rotaclone
(particules/mL)	(DO ₄₅₀)
1,1 x 10 ⁹	> 2,40
3,7 x 10 ⁸	> 2,40
1,2 x 10 ⁸	> 2,40
4,1 x 10 ⁷	> 2,40
1,4 x 10 ⁷	> 2,40
4,5 x 10 ⁶	2,40
1,5 x 10 ⁶	,60
*5,0 x 10 ⁵	,19
1,7 x 10 ⁵	,09

Un échantillon de selles contenant 3,3 x 10¹⁰ particules de Rotavirus par mL a été dilué de façon sérielle avec du diluant échantillons.

*Limite de sensibilité

REPRODUCTIBILITE DU TEST

1. Variation intra-essai

Trois différentes concentrations d'échantillon de rotavirus SA-11 ont été testées 21 fois en double (n=21). Les résultats sont les suivants:

Variation intra-essai	Ech. 1 (négatif)	Ech. 2 (positif faible)	Ech. 3 (positif fort)
Moyenne	0,073	0,204	0,933
Déviati on standard	0,007	0,011	0,045
C.V. (%)	11,9	5,9	8,0

2. Variation inter-essais

Trois différentes concentrations d'échantillon de rotavirus SA-11 ont été testées 21 fois en utilisant le même lot de coffret. Les résultats sont les suivants:

Variation inter-essais	Ech. 1 (négatif)	Ech. 2 (positif faible)	Ech. 3 (positif fort)
Moyenne	0,073	0,204	0,933
Déviati on standard	0,008	0,023	0,100
C.V. (%)	12,3	11,4	10,7

REACTIONS CROISEES

Des pathogènes intestinaux communs et d'autres organismes occasionnellement présents dans les selles ont été testés par le Premier Rotaclone. Des suspensions contenant 10^7 à 10^9 organismes ont été préparées dans des extraits de selles normales avec ou sans rotavirus. Les résultats sont donnés dans le tableau 3. Une étude similaire a été réalisée avec différents virus. Les résultats sont donnés dans le tableau 4.

Tableau 3. Etude de réactions croisées

	Organisme seul	Organisme + virus
Micro-organisme testé	DO ₄₅₀ *	DO ₄₅₀ **
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,08	0,81
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,06	0,66
<i>Staph. aureus</i> (Cowan's)	0,05	0,71
<i>Candida albicans</i>	0,06	0,71
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,06	0,69
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,06	0,72
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,05	0,74
<i>Proteus mirabilis</i>	0,06	0,77
<i>Serratia marcescens</i>	0,07	0,72
<i>Escherichia coli</i>	0,07	0,81
Selles <i>Rotavirus</i> négatives	0,08	—
Selles <i>Rotavirus</i> positives	—	0,78

Tableau 4.

	Organisme seul	Organisme + virus
Virus testé	DO ₄₅₀ *	DO ₄₅₀ **
<i>Echo 22</i>	0,02	1,06
<i>Echo 32</i>	0,02	1,01
<i>Coxsackie A-9</i>	0,02	1,11
<i>Coxsackie B-1</i>	0,02	1,01
<i>Coxsackie B-6</i>	0,02	1,00
<i>Adeno 2</i>	0,02	1,05
<i>Adeno 40</i>	0,02	1,05
<i>Adeno 41</i>	0,02	1,06
Selles <i>Rotavirus</i> négatives	0,02	—
Selles <i>Rotavirus</i> positives	—	1,07

*Suspension de selles à 10% rotavirus négative utilisée comme diluant.

**Suspension de selles à 10% rotavirus positive utilisée comme diluant.



Método Inmunoenzimático para la detección del antígeno de Rotavirus en muestras de materia fecal humana

REF 696004

IVD

Rx Only

USO INDICADO

Premier Rotaclone es un inmunoensayo enzimático (EIA) para la detección del antígeno de rotavirus en muestras de materia fecal humana.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Los Rotavirus son la causa más importante de las gastroenteritis no bacterianas en los niños de corta edad,¹⁻⁵ siendo una enfermedad también observada en niños de edades mayores y en adultos.⁶⁻⁸ Las gastroenteritis rotavíricas pueden producir mortalidad en las poblaciones de riesgo tales como bebés, personas mayores y pacientes inmunocomprometidos.⁶⁻⁹ Las transmisiones nosocomiales de rotavirus son a menudo difíciles y costosas de resolver; por eso, la utilización del test Premier Rotaclone basado en anticuerpos monoclonales, el cual aporta una detección rápida y precisa de los antígenos del rotavirus, puede llevar a una mejor gestión general del paciente.

La microscopía electrónica de transmisión (EM) fue el método inicialmente utilizado para detectar el virus en muestras fecales y biopsias intestinales, permaneciendo como el estándar al cual se comparan los tests diagnósticos de rotavirus.^{1,2} Los Rotavirus son generalmente muy difíciles de detectar in vitro y debido a eso, el cultivo celular no se utiliza rutinariamente para la detección y diagnóstico.^{1,2} El inmunoensayo enzimático (EIA) es un método sencillo y elevadamente sensible para la detección del antígeno de rotavirus siendo a su vez muy indicado para el análisis de un gran número de muestras.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

Premier Rotaclone utiliza anticuerpos monoclonales en un ensayo inmunoquímico del tipo sandwich fase sólida. Los pocillos microtiter de plástico están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el producto del sexto gen viral (V6). Éste es el antígeno específico de grupo para todos los rotavirus humanos conocidos.¹² Se añade una alícuota de suspensión fecal al pocillo y se incuban simultáneamente con un anticuerpo monoclonal anti-rotavirus conjugado a peroxidasa de rábano. El resultado es un sandwich del antígeno rotavirus entre la fase sólida y los anticuerpos ligados al enzima. Después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, se lava el pocillo de muestra para retirar los anticuerpos ligados a enzima que no se han unido. Se añaden sustrato enzimático A y sustrato B a los pocillos y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. El enzima unido en los pocillos convierte el sustrato de incoloro a azul. La intensidad del color azul es directamente proporcional a la concentración de antígeno rotavirus de la muestra.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

1. Microtitulación recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-rotavirus
2. Conjugado Premier Rotaclone - Peroxidasa de rábano conjugada a un anticuerpo monoclonal anti-rotavirus en una solución tampón proteica con gentamicina y 0,02% de timerosal como conservantes.
3. Control Positivo - Rotavirus de simio SA-11 inactivado en solución tampón salina con 0,02% de timerosal como conservante.
4. Diluyente de Muestra - Solución tampón salina con 0,02% de timerosal como conservante.
5. Solución Tampón Sustrato Parte A - Contiene peróxido de urea.
6. Solución Tampón Sustrato Parte B - Contiene tetrametilbencidina (TMB).
7. Solución de Parada - Contiene 1N H₂SO₄.
8. Pipetas de transferencia para muestras
9. Soporte de pocillos para microtitulación

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Tubos de ensayo de 12 x 75 mm, gradilla para tubos de ensayo
2. Agua desionizada o destilada
3. Papel absorbente
4. Puntas de micropipeta de precisión para dispensar 100 µL y 1000 µL (opcional)
5. Recipiente para desechos con blanqueador de uso doméstico diluido 1:10. Para autoclavar, utilizar un desinfectante yodóforo.
6. Lector de placas de micropocillos capaz de leer absorbancias a 450 nm (opcional)
7. Dispositivo para dispensar la solución de lavado tal como una pipeta múltiple, jeringa múltiple, botella de lavado, etc.
8. Cronómetro (mínimo 1 hora)

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
2. No pipetear las muestras o los reactivos con la boca. Evitar el contacto con la piel lastimada o las membranas mucosas.
3. No fumar, beber o comer en áreas donde se manipulan muestras o reactivos del kit.
4. Usar guantes desechables mientras se manipulan las muestras y lavarse las manos después de completar el ensayo. Las muestras de pacientes, los controles del ensayo y todos los materiales que entren en contacto con ellos deberán tratarse con un nivel de Bioseguridad 2, como lo recomienda el manual del CDC/NIH (Center for Disease Control/National Institutes of Health), "Bioseguridad en los Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos".
5. Evitar que la solución de parada (ácido sulfúrico 1N) entre en contacto con la piel. Puede causar irritación y quemaduras. En caso de contacto, lavar con agua abundante.
6. Desechar todos los materiales usados para realizar el ensayo autoclavándolos a 121°C durante una hora como mínimo. Los desechos líquidos pueden eliminarse mezclándolos con blanqueador de uso doméstico diluido 1:10 durante un mínimo de 30 minutos.
PRECAUCIÓN: Los desechos líquidos que contienen solución de parada deben neutralizarse antes de añadirlos al blanqueador de uso doméstico.
7. Evitar el salpicado o la formación de aerosoles.
8. No usar los reactivos de Premier Rotaclone después de la fecha de caducidad del kit. Cada reactivo ha sido optimizado para el máximo rendimiento. La dilución o adulteración de estos reactivos puede provocar una pérdida de la sensibilidad. Los tiempos y las temperaturas de incubación distintos a los especificados pueden producir resultados erróneos.
9. No intercambiar o mezclar lotes distintos de reactivos de Premier Rotaclone.
10. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos ya que puede producir resultados incorrectos. La contaminación de las muestras podría producir resultados erróneos.
11. Utilizar pipetas o puntas de pipetas distintas para cada muestra, control y reactivo.
12. NO REUTILIZAR LOS MICROPOCILLOS.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

 Premier Stop Solution	Palabras de advertencia Peligro indicaciones de peligro H330 - Mortal en caso de inhalación Contiene Sulfuric acid Consejos de prudencia - UE (§28, 1272/2008) P310 - Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico P304 + P340 - EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar P260 - No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol P403 + P233 - Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente cerrado herméticamente
 Premier Substrate B	Palabras de advertencia Peligro indicaciones de peligro H301 - Tóxico en caso de ingestión H311 - Tóxico en contacto con la piel H330 - Mortal en caso de inhalación H370 - Provoca daños en los órganos Contiene Methyl alcohol Consejos de prudencia - UE (§28, 1272/2008) P301 + P310 - EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico P280 - Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección. P310 - Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico P304 + P340 - EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar P403 + P233 - Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente cerrado herméticamente P307 + P311 - EN CASO DE exposición: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico P260 - No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol P309 - EN CASO DE exposición o malestar: P370 + P378 - En caso de incendio: Utilizar arena seca, polvo químico seco o espuma resistente al alcohol para la extinción P210 - Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llama abierta o superficies calientes. - No fumar

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

Almacenar los reactivos del kit a 2-8 C. Antes de utilizarlos, dejar que los reactivos del kit alcancen la temperatura ambiente y refrigerarlos de nuevo inmediatamente a 2-8 C después de usarlos. Volver a colocar todos los micropocillos de microtitulación no utilizados en su bolsa original.

SIGNOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO

Las siguientes condiciones pueden indicar que los reactivos se han deteriorado:

1. Cualquier evidencia de contaminación microbiana o demasiada precipitación.
2. Color azul de las soluciones del sustrato antes de añadir las a los micropocillos.
3. Un valor del control negativo mayor de 0,150 unidades de absorbancia a 450 nm puede indicar deterioro de los reactivos.
4. Un valor del control positivo menor de 0,3 unidades de absorbancia puede indicar que los reactivos se han deteriorado.

Si observa cualquiera de las condiciones descritas, contacte el Departamento de Servicios Técnicos al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. Antes de utilizarlos, dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-30 C).
2. Refrigerar de nuevo todos los reactivos a 2-8 C inmediatamente después de utilizarlos.
3. No permitir que los micropocillos se sequen entre un paso y otro.
4. Preparar un recipiente de descontaminación para desechar los reactivos y los materiales.
5. La obtención de resultados reproducibles in cualquier ensayo EIA depende en gran parte de la uniformidad en el lavado de los micropocillos. Siga la secuencia de lavado cuidadosamente tal como se indica en el procedimiento del ensayo EIA.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de materia fecal deberán recolectarse lo antes posible después de la aparición de los síntomas. Se ha informado que los recuentos más altos de virus ocurren en los días 3-5 después de la aparición de los síntomas. Las muestras recolectadas ocho o más días después de la aparición de los síntomas pueden no contener suficiente cantidad de antígeno de rotavirus para producir una reacción positiva. No recolectar las muestras en recipientes que contengan medio, conservantes, suero animal o detergente, ya que cualquiera de ellos puede interferir con el ensayo Premier Rotaclone.

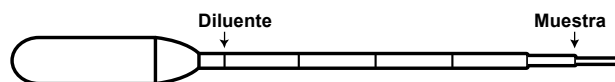
Las muestras diluidas pueden almacenarse a 2-8 C durante tres días, sin que esto interfiera con el rendimiento del ensayo. Para el almacenamiento de larga duración de las muestras sin diluir, se recomienda hacerlo a una temperatura de -20 C o más baja. No se recomienda la congelación y descongelación repetida de las muestras, ya que puede producir resultados erróneos. No almacenar en congeladores que se descongelan automáticamente.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Añadir 1 mL del diluyente de muestra a un tubo apropiadamente rotulado, usando una pipeta de transferencia o de precisión. Añadir las muestras a través de uno de los métodos siguientes:

1. Materia fecal sólida – empujar la muestra hacia la pipeta de transferencia hasta la primera marca.
2. Material fecal líquida – aspirar la muestra con la pipeta de transferencia hasta la primera marca.
3. Hisopo rectal – mover el hisopo de forma giratoria en un ml de diluyente de muestra para que la materia fecal se desprenda. Presionar el hisopo firmemente contra la pared del tubo para extraer el líquido. Mezclar bien. *No volver a diluir.*

Resuspenda la muestra en 1 mL de Diluyente de Muestra.



PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1. Separar el número de micropocillos requeridos para las muestras y los controles e insertarlos en el soporte para pocillos de microtitulación. Registrar la posición de las muestras.
2. Añadir 2 gotas (100 µL) de la muestra de materia fecal diluida, del control positivo y del control negativo (diluyente de muestra) en el fondo de pocillos distintos.
3. Añadir 2 gotas (100 µL) del conjugado enzimático a cada pocillo. Mezclar suavemente con movimientos circulares sobre la mesa.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 60 ± 5 minutos.
5. Verter el líquido de los pocillos en un recipiente de desecho. Golpear el soporte de pocillos de microtitulación invertido sobre papel absorbente, para asegurar que todo el líquido de los pocillos sea retirado.
6. Llenar todos los pocillos con agua desionizada en exceso y verter el líquido como en el Paso 5.
7. Repetir el procedimiento de lavado (Pasos 5 y 6) cuatro veces más (hasta un total de 5 lavados).
8. Añadir 2 gotas (100 µL) de la solución de sustrato A a cada pocillo.
9. Añadir 2 gotas (100 µL) de la solución de sustrato B a cada pocillo.
10. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Las determinaciones visuales pueden realizarse después de la incubación de 10 minutos del paso. Las muestras que presentan una coloración azul más intensa que el control negativo son positivas. Las muestras que exhiben la misma intensidad de color o menor que el control negativo son negativas.

OPCIONAL – Procedimiento Espectrofotométrico

Las determinaciones espectrofotométricas pueden realizarse añadiendo 2 gotas (100 µL) de solución de parada (ácido sulfúrico) a cada pocillo, después de la incubación del paso 10. Leer la absorbancia de cada pocillo a 450 nm, usando un filtro de referencia > 600 nm (opcional) contra un blanco en aire dentro de los 60 minutos posteriores.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

1. **Resultados positivos por determinación visual.** Cualquier muestra que presente un color azul más intenso que el del control negativo es considerada positiva. Cualquier muestra que presente un color igual o menos intenso que el control negativo es considerada negativa.
2. **Resultados positivos por determinación espectrofotométrica.** Las muestras que den unidades de absorbancia (A₄₅₀) mayores de 0,150 son consideradas positivas. Las muestras con absorbancias iguales o menores de 0,150 son consideradas negativas. En muestras que contienen bajas cantidades de antígeno, ocasionalmente puede haber una discrepancia entre los resultados de la determinación visual y la espectrofotométrica. La determinación espectrofotométrica es un método objetivo y por lo tanto más preciso.

NOTA: En las muestras altamente positivas puede formarse un precipitado. Esto no afectará a los resultados.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

El ensayo Premier Rotacalone contiene un control positivo y un control negativo (diluyente de muestra), los cuales deberán utilizarse en cada ensayo para asegurar que los reactivos del kit están funcionando correctamente y que se han seguido los procedimientos del ensayo apropiados. Si se realiza una evaluación visual, el control positivo deberá dar una coloración azul intensa fácilmente distinguible del control negativo. El control negativo deberá ser incoloro o azul poco visible. Si se realiza una determinación espectrofotométrica, retirar todas las burbujas y verificar que no hayan manchas o condensación en la superficie óptica. Limpiarla con un pañuelo de papel suave si es necesario. Si la absorbancia del control positivo no es igual o mayor de 0,3 unidades de absorbancia, se considera que el ensayo no es válido y deberá repetirse. Si los resultados esperados para el control no son observados, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.

VALORES ESPERADOS

La infección por Rotavirus ocurre solamente en ciertas temporadas, y es la causa más frecuente de gastroenteritis en niños entre los 6 meses y 3 años de edad. Entre los niños hospitalizados por gastroenteritis, puede esperarse que el 50% de las muestras de los pacientes darán resultado positivo en el test para rotavirus.¹² La tasa de resultados positivos en el test puede variar de acuerdo con la edad, el clima, factores de la temporada, localización geográfica y el ambiente de salud general del grupo que está siendo estudiado.¹³

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo Premier Rotacalone es altamente específico y sensible para el antígeno de rotavirus. Esto no excluye la presencia de otros organismos patogénicos. Si bien la relación entre los rotavirus y la gastroenteritis está bien establecida, se puede dar la coinfección con patógenos bacterianos. Se deberán realizar análisis bacterianos en paralelo a Premier Rotacalone para descartar que la enfermedad tenga una etiología bacteriana.

El análisis clínico de la materia fecal neonatal con Premier Rotacalone indica una buena especificidad y la ausencia de falsos positivos,¹³ sin embargo, los resultados deben interpretarse con precaución. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección por rotavirus, ya que una cantidad de virus muy pequeña o un muestreo inadecuado o inapropiado puede producir un resultado falso negativo.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El test Premier Rotacalone fue ensayado en colaboración con dos laboratorios independientes localizados en la región Noroccidental y Suroriental de los EE.UU., en un total de 121 muestras de materia fecal provenientes de niños con gastroenteritis. Los resultados obtenidos con Premier Rotacalone fueron comparados con aquellos obtenidos con microscopía electrónica (ME). Los resultados discrepantes fueron resueltos mediante el uso de un inmunoensayo enzimático de bloqueo,¹⁴ análisis de ARN o serología. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

		EM		EM/RNA		Kallestad	
		+	-	+	-	+	-
Premier Rotacalone	+	36	3	38	1	29	0
	-	0	35	0	35	7	49
Sensibilidad		100%		100%		81%	
Especificidad		92%		97%		100%	
Concordancia		96%		99%		92%	

LÍMITES DE DETECCIÓN

Diluciones seriadas de rotavirus humano, con un número de partículas virales conocido por determinación en ME, fueron analizadas con el test Premier Rotacalone®. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

ME	Premier Rotacalone®
(# de partículas virales/mL)	(A ₄₅₀)
1,1 x 10 ⁹	> 2,40
3,7 x 10 ⁸	> 2,40
1,2 x 10 ⁸	> 2,40
4,1 x 10 ⁷	> 2,40
1,4 x 10 ⁷	> 2,40
4,5 x 10 ⁶	2,40
1,5 x 10 ⁶	,60
*5,0 x 10 ⁵	,19
1,7 x 10 ⁵	,09

Se hicieron diluciones seriadas de una muestra de materia fecal que contenía 3,3 x 10¹⁰ partículas de rotavirus/mL con diluyente de muestra.

*Límites de sensibilidad

REPRODUCIBILIDAD

1. Variabilidad dentro de la misma prueba Tres concentraciones diferentes de muestras con Rotavirus SA-11 fueron analizadas veintitres veces en duplicado (n=21). Los resultados se muestran a continuación:

Variabilidad dentro de la misma prueba	Muestra I (Negativa)	Muestra II (Positiva Baja)	Muestra III (Positiva Alta)
Absorbancia Media	0,059	0,184	0,561
Desviación estándar	0,007	0,011	0,045
Coefficiente de Variación %	11,9	5,9	8,0

2. Variabilidad entre prueba y prueba. Tres concentraciones diferentes de muestras con Rotavirus SA-11 fueron analizadas veintitres veces utilizando kits de un mismo Lote. Los resultados se muestran a continuación:

Variabilidad entre prueba y prueba	Muestra I (Negativa)	Muestra II (Positiva Baja)	Muestra III (Positiva Alta)
Absorbancia Media	0,073	0,204	0,933
Desviación estándar	0,008	0,023	0,100
Coefficiente de Variación %	12,3	11,4	10,7

REACTIVIDAD CRUZADA

Los patógenos intestinales comunes, y otros microorganismos que se encuentran presentes ocasionalmente en las materias fecales, fueron analizados con el test Premier Rotaclone. Las suspensiones que contenían entre 10⁷ y 10⁹ organismos fueron preparadas en extractos de materia fecal normal con o sin rotavirus. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Un experimento similar fue realizado con una variedad de virus. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3. Reactividad Cruzada del estudio

Microorganismo analizado	A ₄₅₀ *	A ₄₅₀ **
	Organismo solo	Organismo y virus
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,08	0,81
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,06	0,66
<i>Staph. aureus</i> (Cowan's)	0,05	0,71
<i>Candida albicans</i>	0,06	0,71
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,06	0,69
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,06	0,72
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,05	0,74
<i>Proteus mirabilis</i>	0,06	0,77
<i>Serratia marcescens</i>	0,07	0,72
<i>Escherichia coli</i>	0,07	0,81
Heces <i>Rotavirus</i> negativa	0,08	—
Heces <i>Rotavirus</i> positiva	—	0,78

Tabla 4.

Virus analizado	A ₄₅₀ *	A ₄₅₀ **
	Organismo solo	Organismo y virus
<i>Echo 22</i>	0,02	1,06
<i>Echo 32</i>	0,02	1,01
<i>Coxsackie A-9</i>	0,02	1,11
<i>Coxsackie B-1</i>	0,02	1,01
<i>Coxsackie B-6</i>	0,02	1,00
<i>Adeno 2</i>	0,02	1,05
<i>Adeno 40</i>	0,02	1,05
<i>Adeno 41</i>	0,02	1,06
Heces <i>Rotavirus</i> negativa	0,02	—
Heces <i>Rotavirus</i> positiva	—	1,07

*Suspensión al 10% de heces rotavirus negativa usada como diluyente.

**Suspensión al 10% de heces rotavirus positiva usada como diluyente.



ELISA zum Nachweis von Rotavirus-Antigen in humanen Stuhlproben

REF 696004

IVD

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Der Premier Rotaclone Test ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis von Rotavirus-Antigenen in humanen Stuhlproben.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Rotaviren sind die häufigste Ursache von nicht-bakteriellen Gastroenteritiden im frühen Kindesalter,¹⁻⁵ die Erkrankung ist jedoch auch bei älteren Kindern und Erwachsenen zu beobachten.⁶⁻⁸ Rotavirus-Gastroenteritiden können in Populationen mit erhöhtem Risiko wie bei Säuglingen, älteren Menschen und immunsupprimierten Patienten zum Tode führen.⁶⁻⁹ Die nosokomiale Übertragung von Rotaviren ist häufig ein kostspieliges und nur schwer zu lösendes Problem. Hier kann der Premier Rotaclone-Test zu einer besseren Patienten-Führung beitragen. Er beruht auf monoklonalen Antikörpern und liefert einen schnellen präzisen Nachweis von Rotavirus-Antigenen.

Die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (EM) war die erste Methode, mit der Viren in fäkalen Proben und intestinalen Biopsie-Materialien nachgewiesen wurden. Sie bleibt auch die Standard-Methode, mit der diagnostische Rotavirus-Tests verglichen werden.^{1,2} Rotaviren sind im allgemeinen *in vitro* nur sehr schwer nachzuweisen, daher wird die Zellkultur nicht routinemäßig zum Nachweis und zur Diagnose eingesetzt.^{1,2} Der Enzym-Immunoassay (ELISA) ist eine einfache, hochsensitive Methode zum Nachweis von Rotavirus-Antigen und ist zur Analyse großer Probenzahlen sehr gut geeignet.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Der Premier Rotaclone Test verwendet monoklonale Antikörper und ist ein Festphasen-Sandwich-ELISA. Die Mikrotiter-Kavitäten aus Kunststoff sind mit einem monoklonalem Antikörper beschichtet, der gegen das Produkt des sechsten viralen Gens (VP6) gerichtet ist; dies ist das gruppen-spezifische Antigen aller bekannten humanpathogenen Rotaviren.¹² Ein Aliquot einer fäkalen Suspension wird in die Kavität gefüllt und gleichzeitig mit einem anti-Rotavirus monoklonalem Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, inkubiert, so daß das Rotavirus-Antigen wie in einem Sandwich zwischen der festen Phase und den Enzym-gebundenen Antikörpern eingeschlossen ist. Nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Kavität gewaschen, um ungebundene Enzym-markierte Antikörper zu entfernen. Enzym-Substrat A (Harnstoffperoxid) und Substrat B (TMB) werden hinzugefügt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Enzym, das in der Kavität gebunden ist, verwandelt das farblose Substrat in ein blaues Produkt. Die Intensität der blauen Farbe ist direkt proportional zur Konzentration des Rotavirus-Antigen in der Probe.

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Aussenseite der Packung angegeben.

1. Mikrotiter-Kavitäten beschichtet mit anti-Rotavirus monoklonalem Antikörper.
2. Fläschchen Premier Rotaclone -Konjugat: Meerrettich-Peroxidase konjugiert mit anti-Rotavirus monoklonalem Antikörper in einer gepufferten Proteinlösung mit Gentamicin und 0,02% Thiomersal als Konservierungsmittel.
3. Fläschchen Positiv-Kontrolle: inaktiviertes affenpathogenes Rotavirus SA-11 in gepufferter isotone Kochsalzlösung mit 0,02% Thiomersal als Konservierungsmittel.
4. Fläschchen Proben-Verdünnungspuffer: gepufferte isotone Kochsalzlösung mit 0,02% Thiomersal als Konservierungsmittel.
5. Fläschchen Lösung A: Substrat-Puffer, enthält Harnstoffperoxid.
6. Fläschchen Lösung B: Substrat-Lösung, enthält Tetramethylbenzidin (TMB).
7. Fläschchen Stopp-Lösung: enthält 1 N Schwefelsäure.
8. Transfer-Pipetten für Proben
9. Halter für Mikrotiter-Kavitäten

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Reagenzröhrchen (12 x 75 mm), Ständer für Reagenzröhrchen
2. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
3. Papiertücher
4. Präzisions-Mikropipettenspitzen für 100 µL oder 1000 µL (wahlweise)
5. Abfallbehälter mit einer 1:10 Verdünnung von Haushaltsbleichmittel, zum Autoklavieren ein Jod-haltiges Desinfektionsmittel verwenden.
6. ELISA-Plattenphotometer für Extinktionsmessungen bei 450 nm (wahlweise)
7. Multikanal-Pipette, Mehrfach-Spritze, Waschflasche oder andere Hilfsmittel zum Einfüllen der Waschlösung
8. Stoppuhr (mindestens für 1 Stunde)

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
3. In den Bereichen, in denen mit den Proben oder den Test-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
4. Einmal-Handschuhe während des Umgangs mit Proben tragen und die Hände nach Abschluß des Tests waschen. Patienten-Proben, Test-Kontrollen und alle Materialien, die mit ihnen in Berührung kommen, sollten nach den Biosafety Level 2 – Empfehlungen des CDC/NIH Handbuchs "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories" gehandhabt werden.
5. Hautkontakt mit der Stopp-Lösung vermeiden (1N Schwefelsäure). Sie könnte Irritationen und Verätzungen verursachen. Bei Hautkontakt mit Wasser spülen.
6. Vor der Entsorgung alle Materialien, die während des Tests benutzt wurden, mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklavieren. Flüssig-Abfall kann entsorgt werden, nachdem er mindestens 30 Minuten mit einer 1:10 Verdünnung von Haushaltsbleichmittel gemischt wurde.
Vorsicht: Flüssigabfall, der Stopp-Lösung enthält, muß neutralisiert werden, bevor er in Haushaltsbleichmittel gegeben wird.
7. Vermeiden Sie jedes Verspritzen oder Zerstäuben.
8. Die Premier Rotaclone Reagenzien nach Ablauf des Haltbarkeitsdatum nicht mehr verwenden. Jedes Reagenz ist in seiner Konzentration und Zusammensetzung optimiert worden. Verdünnung oder Verfälschung dieser Reagenzien kann zu einem Verlust der Sensitivität führen. Von den Angaben abweichende Inkubationszeiten und Temperaturen können falsche Ergebnisse zur Folge haben.
9. Reagenzien des Premier Rotaclone Tests mit unterschiedlicher Chargennummern sollten nicht ausgetauscht oder gemischt werden.
10. Mikrobiellen Befall der Reagenzien vermeiden, er könnte die Ergebnisse verfälschen. Die Kontamination der Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
11. Für jede Probe, Kontrolle oder jedes Reagenz sollten gesonderte Pipetten oder Pipetten-Spitzen verwendet werden.
12. Mikrotiterkavitäten nicht wiederverwenden.

GEFÄHRDUNGEN UND SICHERHEITSHINWEISE

 Premier Stop Solution	SIGNALWORT Gefahr Gefahrenhinweise H330 - Lebensgefahr bei Einatmen Enthält Sulfuric acid Sicherheitshinweise - Verordnung (EG) §28, Nr. 1272/2008 P310 - Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen P304 + P340 - BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert P260 - Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen P403 + P233 - Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren
 Premier Substrate B	SIGNALWORT Gefahr Gefahrenhinweise H301 - Giftig bei Verschlucken H311 - Giftig bei Hautkontakt H330 - Lebensgefahr bei Einatmen H370 - Schädigt die Organe Enthält Methyl alcohol Sicherheitshinweise - Verordnung (EG) §28, Nr. 1272/2008 P301 + P310 - BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen P280 - Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. P310 - Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen P304 + P340 - BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert P403 + P233 - Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren P307 + P311 - BEI Exposition: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen P260 - Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen P309 - BEI Exposition oder Unwohlsein: P370 + P378 - Bei Brand: Trocken Sand, Trockenlöschpulver oder alkoholbeständigen Schaum zum Löschen verwenden P210 - Von Hitze/Funken/offenen Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Lagern Sie die Test-Reagenzien bei 2-8 C. Vor dem Gebrauch die Test-Reagenzien auf Raumtemperatur bringen und nach Gebrauch sofort wieder auf 2-8 C abkühlen. Alle unbenutzten Mikrotiter-Kavitäten in den Originalbeutel zurücklegen.

ANZEICHEN VON QUALITÄTSMINDERUNG

Die folgenden Umstände können einen Verderb der Reagenzien anzeigen.

1. Jeder offensichtliche mikrobielle Befall oder deutliche Niederschlag
2. Jede Blaufärbung in der Substratlösung, bevor sie den Kavitäten zugesetzt wird.
3. Ein Extinktionswert der Negativ-Kontrolle > 0,150 bei einer Wellenlänge von 450 nm kann einen Verfall der Reagenzien anzeigen.
4. Ein Extinktionswert der Positiv-Kontrolle von < 0,3 kann einen Verderb der Reagenzien anzeigen.

Wenn eine der obigen Beobachtungen gemacht wird, kontaktieren Sie Meridian Bioscience.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

1. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen (20-30 C).
2. Sofort nach Gebrauch alle Reagenzien wieder auf 2-8 C kühlen.
3. Zwischen den Arbeitsschritten die Kavitäten nicht austrocknen lassen.
4. Ein Desinfektions-Gefäß zur Entsorgung von Reagenzien und Materialien bereitstellen.
5. Die Reproduzierbarkeit eines jeden ELISA ist stark von der Gleichförmigkeit des Waschens der Mikrotiter-Kavitäten abhängig. Beachten Sie die in der Anleitung empfohlenen Waschschritte genau.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Stuhlproben sollten so bald wie möglich nach dem Eintreten der Symptome genommen werden. Ein Maximum der Virus-Konzentration wird bei 3-5 Tagen nach Einsetzen der Symptome beschrieben. Proben, die 8 Tage nach Einsetzen der Symptome oder später gewonnen wurden, enthalten unter Umständen nicht genügend Rotavirus-Antigen, um eine positive Reaktion zu zeigen. Die Proben sollten nicht in Gefäße mit Nährmedien, Konservierungsmitteln, Tierseren oder Detergenzien überführt werden, da diese den Premier Rotaclone - Test beeinträchtigen könnten.

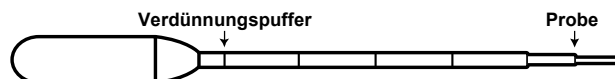
Verdünnte Proben können bei 2-8 C 3 Tage lang ohne Beeinträchtigung der Testergebnisse gelagert werden. Für die langfristige Lagerung unverdünnter Proben wird eine Temperatur von -20 C oder kälter empfohlen. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist nicht zu empfehlen und kann zu falschen Ergebnissen führen. Nicht in selbstabtauenden Gefrierschränken lagern.

PROBENNAHME UND – VORBEREITUNG

1 mL Proben-Verdünnungspuffer mit einer Transfer-Pipette oder Präzisions-Pipette in ein sorgfältig beschriftetes Röhrchen geben. Die Proben wie folgt dazugeben:

1. Fester Stuhl: Probe bis zur ersten Markierung in die Transfer-Pipette drücken.
2. Flüssiger Stuhl: Probe mit der Transfer-Pipette bis zur ersten Markierung hochziehen.
3. Rektaler Abstrichtupfer. Tupfer in 1 ml Proben-Verdünnungspuffer quirlen, so daß das fäkale Material gelöst wird. Den Tupfer durch festes Drücken an die Wand des Röhrchens auspressen. Sorgfältig mischen. *Nicht weiter verdünnen.*

Probe in 1 mL Probenverdünnungspuffer aufsuspensieren.



TESTDURCHFÜHRUNG

1. Eine ausreichende Anzahl von Kavitäten für Proben und Kontrollen abbrechen und in den Halter für die Kavitäten einsetzen. Die Plätze der Proben notieren.
2. Je 2 Tropfen (100 µL) von der verdünnten fäkalen Probe, der Positiv – und der Negativ – Kontrolle (Proben-Verdünnungspuffer) auf den Boden der Kavitäten geben.
3. In jede Kavität 2 Tropfen (100 µL) Enzym-Konjugat geben. Durch vorsichtiges Bewegen auf der Tisch-Oberfläche mischen.
4. Bei Raumtemperatur 60 ± 5 Minuten inkubieren.
5. Die Flüssigkeit aus den Kavitäten in einen Abfallbehälter auskippen. Den Kavitäten-Halter umgedreht auf Papiertüchern kräftig ausklopfen, um sicher zugehen, daß die Flüssigkeit vollständig aus den Kavitäten entfernt wurde.
6. Alle Kavitäten bis zum Überfließen mit deionisiertem Wasser füllen und die Flüssigkeit wie in Schritt 5 ausgießen.
7. Den Waschvorgang (Schritt 5 und 6) vier weitere Male durchführen (insgesamt also 5 Waschvorgänge).
8. 2 Tropfen (100 µL) Substrat-Lösung A in jede Kavität geben.
9. 2 Tropfen (100 µL) Substrat-Lösung B in jede Kavität geben.
10. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Das Ablesen des Ergebnisses mit bloßem Auge ist nach den 10 Minuten Inkubation in Schritt 10 möglich. Proben mit einer Blaufärbung, die dunkler als die der Negativ-Kontrolle ist, sind positiv. Proben, die gleiche oder eine schwächere Blaufärbung als die Negativ-Kontrolle aufweisen, sind negativ.

WAHLWEISE: SPEKTROPHOTOMETRISCHE AUSWERTUNG

Spektrophotometrische Auswertungen können durchgeführt werden, indem 2 Tropfen (100 µL) Stopp-Lösung (Schwefelsäure) in jede Kavität nach der Inkubation von Schritt 10 gegeben werden. Die Extinktion jeder Kavität wird bei 450 nm (gegebenenfalls mit einem Referenzfilter > 600 nm) nach einem Abgleich gegen Luft innerhalb von 60 Minuten abgelesen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

1. **Positive Ergebnisse bei Auswertung mit dem bloßen Auge:** jede Probe mit einer blauen oder im Vergleich zur Negativ-Kontrolle intensiveren Farbe wird als positiv betrachtet. Jede Probe mit einer Farbe, die im Vergleich zur Negativ-Kontrolle gleich oder weniger intensiv gefärbt ist, wird als negativ betrachtet.
2. **Positive Ergebnisse bei spektrophotometrischer Bestimmung:** Proben mit einem Extinktionswert (A_{450}) > 0,150 werden als positiv betrachtet. Proben mit einer Extinktion $\leq 0,150$ werden als negativ betrachtet. Bei Proben mit geringen Antigen-Mengen können die Ergebnisse aus der photometrischen Bestimmung gelegentlich von den Auswertungen mit bloßem Auge abweichen. Die spektrophotometrische Bestimmung ist die objektivere und daher die etwas genauere Methode.

ACHTUNG: in stark positiven Proben können sich Niederschläge bilden. Diese beeinflussen die Ergebnisse nicht.

QUALITÄTSKONTROLLE

Führen Sie den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durch.

Der Premier Rotacalone Test beinhaltet eine Positiv-Kontrolle und eine Negativ-Kontrolle (Proben-Verdünnungspuffer), die bei jedem Testlauf mitlaufen sollten, um sicherzustellen, daß die Test-Kit-Reagenzien in Ordnung sind, und daß die Arbeitsschritte korrekt durchgeführt wurden. Wenn eine Auswertung mit dem bloßen Auge erfolgt, sollte die Positivkontrolle tief blau und deutlich von der Negativ-Kontrolle zu unterscheiden sein. Die Negativ-Kontrolle sollte farblos oder schwach blau sein. Bei einer spektrophotometrischen Auswertung sollten alle Blasen entfernt und die optische Oberfläche auf Flecken oder Kondensationen untersucht werden; falls nötig, mit einem weichen Tuch abwischen. Wenn die Extinktion der Positiv-Kontrolle $\leq 0,3$ Extinktionseinheiten liegt, sollte der Test als ungültig betrachtet und wiederholt werden. Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, wiederholen Sie als Erstes zur Ermittlung der Fehlerquelle die Kontrolltests. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Vertriebspartner.

ERWARTETE WERTE

Rotavirus-Infektionen sind saisonalen Schwankungen unterworfen, sie sind die häufigste Ursache von Gastroenteritiden bei Kindern zwischen 6 Monaten und 3 Jahren. Unter den Kindern, die wegen einer Gastroenteritis ins Krankenhaus eingewiesen werden, ist eine Rate positiver Rotavirus-Testergebnisse von bis zu 50% zu erwarten.¹² Die Rate positiver Testergebnisse kann in Abhängigkeit vom Alter, vom Wetter, von saisonalen und geographischen Faktoren und von allgemeinen Gesundheitsbedingungen der zu untersuchenden Gruppe variieren.¹³

EINSCHRÄNKUNGEN

Der Premier Rotacalone Test ist hochspezifisch und – sensitiv für Rotavirus Antigen. Dies schließt nicht die Anwesenheit anderer pathogener Organismen aus. Obwohl ein klarer Zusammenhang zwischen Rotaviren und Gastroenteritis besteht, sind Ko-Infektionen mit bakteriellen Keimen möglich. Tests auf Bakterien sollten parallel zum Premier Rotacalone Test durchgeführt werden, um eine bakterielle Ätiologie der Erkrankung auszuschließen.

Klinische Untersuchungen von Stühlen Neugeborener mit dem Premier Rotacalone Test zeigen eine gute Spezifität und keine falsch positiven Ergebnisse,¹³ dennoch müssen die Ergebnisse vorsichtig bewertet werden. Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Rotavirus-Infektion nicht aus, da eine zu geringe Menge Virus oder eine unzureichende oder falsch durchgeführte Probenentnahme falsch negative Ergebnisse verursachen können.

LEISTUNGSMERKMALE

Der Premier Rotacalone Test, wurde in Zusammenarbeit mit zwei unabhängigen Labors im Nord – und Südwesten der USA überprüft. Dabei wurden 121 Stuhlproben von Kindern mit Gastroenteritis getestet und mit den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie (EM) verglichen. Abweichende Ergebnisse wurden durch die Anwendung eines Bestätigungstests,¹⁴ durch RNA-Analyse oder Serologie endgültig bewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1.

		EM		EM/RNA		Kallestad	
		+	-	+	-	+	-
	Premier Rotacalone	36	3	38	1	29	0
	+	0	35	0	35	7	49

Sensitivität	100%	100%	81%
Spezifität	92%	97%	100%
Übereinstimmung	96%	99%	92%

NACHWEISGRENZEN

Menschliche Rotaviren, deren Konzentration durch EM bestimmt wurde, wurden in Verdünnungsreihen mit dem Premier Rotacalone Test getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2.

ME (Teilchenzahl/mL)	Premier Rotacalone (A_{450})
$1,1 \times 10^9$	> 2,40
$3,7 \times 10^8$	> 2,40
$1,2 \times 10^8$	> 2,40
$4,1 \times 10^7$	> 2,40
$1,4 \times 10^7$	> 2,40
$4,5 \times 10^6$	2,40
$1,5 \times 10^6$	,60
$5,0 \times 10^5$	,19
$1,7 \times 10^5$	,09

Aus einer Stuhlprobe mit $3,3 \times 10^{10}$ Rotaviruspartikeln/mL war mit einem Probenverdünnungsmittel eine Verdünnungsreihe hergestellt worden.

*Grenzen der Sensitivität

REPRODUZIERBARKEIT

1. Variabilität innerhalb eines Testlaufs

Drei verschiedene Konzentrationen von SA-11 Rotavirus-Proben wurden 21 mal mit je 2 Aliquoten (n=21) analysiert. Die Ergebnisse waren folgende:

Intra-Assay-Varianz	Probe I (Negativ)	Probe II (Schwach Pos)	Probe III (Stark Pos)
Mittlere Extinktion	0,059	0,184	0,561
Standardabweichung	0,007	0,011	0,045
C.V. (%)	11,9	5,9	8,0

2. Variabilität zwischen den Testläufen (Inter-Assay Varianz) Drei verschiedene Konzentrationen von SA-11 Rotavirus-Proben wurden 23 mal mit je 2 Aliquots (n=21) analysiert. Die Ergebnisse waren folgende:

Inter-Assay-Varianz	Probe I (Negativ)	Probe II (Schwach Pos)	Probe III (Stark Pos)
Mittlere Extinktion	0,073	0,204	0,933
Standardabweichung	0,008	0,023	0,100
C.V. (%)	12,3	11,4	10,7

KREUZREAKTIVITÄT

Häufige pathogene Keime des Darms und andere Organismen, die gelegentlich in Faeces auftreten, wurden mit dem Premier Rotaclone Test getestet. Suspensionen mit 10^7 bis 10^9 Organismen wurden in normale Stuhlextrakte mit und ohne Rotaviren eingebracht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Ein ähnliches Experiment wurde mit einer Vielzahl von Viren durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3. Studie zur Kreuzreaktivität

	A ₄₅₀ *	A ₄₅₀ **
Getestete Mikroorganismen	Organismus allein	Organismus plus Virus
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,08	0,81
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,06	0,66
<i>Staph. aureus</i> (Cowan's)	0,05	0,71
<i>Candida albicans</i>	0,06	0,71
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,06	0,69
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,06	0,72
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,05	0,74
<i>Proteus mirabilis</i>	0,06	0,77
<i>Serratia marcescens</i>	0,07	0,72
<i>Escherichia coli</i>	0,07	0,81
Rotavirus negativer Stuhl	0,08	—
Rotavirus positiver Stuhl	—	0,78

Tabelle 4.

	A ₄₅₀ *	A ₄₅₀ **
Getestete Viren	Organismus allein	Organismus plus Virus
Echo 22	0,02	1,06
Echo 32	0,02	1,01
Coxsackie A-9	0,02	1,11
Coxsackie B-1	0,02	1,01
Coxsackie B-6	0,02	1,00
Adeno 2	0,02	1,05
Adeno 40	0,02	1,05
Adeno 41	0,02	1,06
Rotavirus negativer Stuhl	0,02	—
Rotavirus positiver Stuhl	—	1,07

*Zur Verdünnung wurde eine Rotavirus-negative 10% Stuhlsuspension eingesetzt

**Zur Verdünnung wurde eine Rotavirus-positive 10% Stuhlsuspension eingesetzt

REFERENCES

- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH and Ruck BJ. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. Lancet i: 1974;149-151.
- Kapikian AZ, Yolken RH, Greenberg HB, Wyatt RG, Kalica AR, Chanock RM, Kim HW. Gastroenteritis viruses. In Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 5th ed. Lennette, EH., Schmidt, NJ., Eds. Amer. Pub. Health Assoc., Washington, D.C., 1980;927-996.
- Flewen TH and Woode GN. The Rotaviruses. Arch. Virology, 1978;57:1-23.
- Steinhoff MC. Rotavirus: The first five years. J Ped. 1980;96:611-622.
- Blacklow NR and Cukor G. Viral gastroenteritis. N Engl J Med. 1981;304:397-406.
- Wenman WM, Hinde D, Feltham S, Gurwith M. Rotavirus infection in adults. Results of a Prospective Study. N Engl J Med. 1979;301:303-306.
- Cubitt WD. Rotavirus infection: an unexpected hazard in units caring for the elderly. Geriatric Medicine Today. 1982;1:33-38.
- Marrie TJ, Spencer HS, Faulkner RS, Ethier J, Young CH. Rotavirus infection in a geriatric population. Arch Intern Med. 1982;142:313-316.
- Coulson BS, Holmes IH. An improved enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of rotavirus in faeces of neonates. Virol Methods. 1984;8:165-179.
- Yolken RH, Kim HW, Clem T, Wyatt RG, Kalica AR, Chanock RM and Kapikian AZ. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. Lancet ii: 1977;263-266.
- Yolken RH and Leilster F. Evaluation of enzyme immunoassays for detection of human rotavirus. J Infect Dis. 1981;144, p. 379.
- Cukor G, Perron DM, Hudson R, Blacklow NR. Detection of rotavirus in human stools by using monoclonal antibody. J Clin Micro. 1984;19:888-892.
- Herrmann JE, Blacklow NR, Perron DM, Cukor G, Krause PJ, Hyams JS, Barrett HJ, Ogra PL. Monoclonal antibody enzyme immunoassay for detection of rotavirus in stool specimens. J Infect Dis. 1985;152:830-832.
- Yolken RH. Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids: Current Limitations and Future Prospects. Rev Infect Dis. 1982;4:35-68.



 Manufactured By	Meridian Bioscience, Inc. 3471 River Hills Drive Cincinnati, OHIO - 45244 USA www.meridianbioscience.com <u>Contacts:</u> Main Telephone (+1) 513.271.3700 Customer Service/Orders 800.543.1980 Technical Support Center 800.343.3858 Information Fax: 513.272.5432 Ordering Fax: 513.271.0124 E-mail: info@meridianbioscience.com
	Meridian Bioscience Europe, SRL Via Dell'Industria 7, 20035 Villa Cortese (Milano) ITALY www.meridianbioscience.com <u>Contacts:</u> Main Telephone (+39) 0331.433636 E-mail: info@meridianbioscience.eu Technical Support: MBE-TechService@meridianbioscience.eu Customer Service/Orders: - For Italian Customers: ordini@meridianbioscience.com - For Distributors / International Customers: Export.CustomerService@meridianbioscience.eu
AUSTRALIAN SPONSOR	Emergo Australia Level 20, Tower II Darling Park 201 Sussex Street Sydney, NSW 2000 Australia
UK Authorised Representative	Launch Diagnostics Limited Lakeview West Crossways Business Park Galleon Boulevard Dartford Kent DA2 6QE United Kingdom

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/package of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guía de símbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	Meridian products carrying the European Conformity (CE) mark fulfill the requirements of Directive 98/79/EC or the Regulation 2017/746 on in-vitro diagnostic medical devices / I prodotti Meridian recanti il marchio di Conformità Europea (CE) soddisfano i requisiti della Direttiva 98/79/CE o del Regolamento 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Les produits Meridian portant la marque de Conformité européenne (CE) sont conformes aux exigences de la Directive 98/79/CE ou du Règlement 2017/746 relatifs aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Los productos de Meridian que llevan la marca de conformidad europea (CE) cumplen los requisitos de la Directiva 98/79/CE o del Reglamento 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Produkte von Meridian mit der CE-Kennzeichnung erfüllen die Anforderungen der EU-Richtlinie 98/79/EG bzw. der Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenzubereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
			CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaución: Peligroso / WARNUNG: Risikogefahr
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Numero de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Eingrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabbricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" test / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjugado enzimático / enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
R_x Only	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Detection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz
	Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / ne pas utiliser si le paquet est endommagé / No use si el paquete esta dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist	TUBE	Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß
	Single Use Only / Prodotto Monouso / A usage unique / Para Un Solo Uso / nur für die einmalige Anwendung	CH REP	Swiss Authorized Representative / Mandatario svizzero / Mandataire Suisse / Representante Autorizado Suizo / Schweizer Bevollmächtigter

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at 800-543-1980.