

TEST INMUNOCROMATOGRÁFICO EN UN SOLO PASO PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE ROTAVIRUS EN HECES

Solo para diagnóstico In Vitro. Para uso exclusivo en laboratorios clínicos y de gabinete. Conservar entre 8°C a 30°C

FINALIDAD PREVISTA

El inmunoensayo cromatográfico Simple Rotavirus es un procedimiento para la detección cualitativa in vitro de antígenos de Rotavirus en la materia fecal.

INTRODUCCIÓN

El rotavirus es la principal causa de gastroenteritis aguda. Las gastroenteritis por virus entéricos pueden resultar mortales en poblaciones de riesgo como niños, ancianos o individuos inmuno suprimidos. Su transmisión tiene lugar por vía oral-fecal, siendo el periodo de incubación entre 1 y 3 tres días. Los síntomas característicos son vómitos, diarrea acuosa entre 3 y 8 días, fiebre y dolor abdominal. La inmunización tras la primera infección es incompleta pero infecciones posteriores tienden a ser menos severas que la inicial.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El test Simple Rotavirus utiliza anticuerpos monoclonales contra el antígeno VP6 del grupo A de rotavirus, conjugados a partículas de látex rojas y anticuerpos monoclonales específicos para rotavirus en la membrana.

En este test la muestra es tratada primeramente con un diluyente de muestra para extraer los antígenos de rotavirus de las heces. Tras la extracción, sólo se necesita poner el extracto en el dispositivo de reacción. Cuando el extracto de la muestra fluye a través de la membrana del test, las partículas coloreadas migran. En el caso de un resultado positivo los anticuerpos específicos, presentes en la membrana, capturarán las partículas coloreadas.

Diferentes líneas de color serán visibles, dependiendo del contenido de virus en la muestra. Estas líneas se usan para interpretar el resultado, a los cinco minutos de incubación temperatura ambiente.

MATERIALES INCLUIDOS EN EL KIT

- 20 Dispositivos de reacción Simple.
- 20 Viales con el tampón de dilución.

PRECAUCIONES

1. Las muestras pueden contener agentes infecciosos y deberán ser tratadas y desechadas como materiales biológicos potencialmente peligrosos.
2. El tampón contiene azida de sodio como agente antimicrobiano. Evitar el contacto directo con la piel y las mucosas. Desechar de forma apropiada. No usar el tampón si manifiesta indicios de contaminación o precipitación.
3. No comer, beber, fumar, almacenar o preparar alimentos en la zona donde se manejan los reactivos y las muestras.
4. Llevar guantes desechables al manejar las muestras. Lavarse bien las manos al acabar de trabajar.

5. No intercambiar los componentes de kits con distinto numero de lote.
6. Utilizar todos los reactivos únicamente in vitro.
7. Antes de usarlos, dejar que todos los componentes del kit y muestras alcancen la temperatura ambiente, pues reactivos y/o muestras fríos pueden reducir la funcionalidad del test. Se recomiendan de 20 a 30 minutos para alcanzar la temperatura ambiente.
8. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
9. En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado
10. Es importante añadir la cantidad correcta de muestra (4- 5 gotas de suspensión). Si es inferior a la indicada puede ser que no se realice la cromatografía porque no llegue muestra a la zona de reacción, si es superior pueden aparecer líneas marrones en vez de rojas.
11. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
12. No usar el test si aparece alguna línea de color en la zona de resultados antes de empezar a usarlo.
13. Es importante tomar la cantidad de materia fecal adecuada: 30-50 mg de heces sólidas ó <100 ul de heces líquidas. Un exceso de muestra impide la correcta Cromatografía.

ALMACENAMIENTO

Se puede conservar a cualquier temperatura comprendida entre 2 y 30 °C (no es recomendable almacenarlo en nevera) Su fecha de caducidad está impresa en la envoltura.

MUESTRAS

Se deben recoger las muestras fecales tan pronto como sea posible después del comienzo de los síntomas. A la semana de la aparición de los primeros síntomas el título de virus empieza a decrecer y por lo tanto pueden ser más difíciles de identificar.

Las muestras pueden guardarse en el refrigerador (4 °C aprox.) durante 1 o 2 días antes de ser analizadas. Para una conservación más prolongada, deben guardarse en el congelador a -20 °C sin manipulación previa. En este caso, la muestra será descongelada totalmente, llevada a temperatura ambiente y homogeneizada antes de analizarla.

PROCEDIMIENTO

1. Desenroscar el tapón del vial con cuidado de no derramar el tampón de extracción. Con el extremo del aplicador tomar una cantidad suficiente de heces (30 – 50 mg). Si las heces son líquidas coger con ayuda de una pipeta 100 micros litros y transferirlos al vial.
2. Introducir el aplicador con la muestra en el vial. Enroscar bien el tapón y agitar vigorosamente para asegurar una mezcla homogénea.
3. Sacar el dispositivo de reacción de la bolsa de aluminio. Desechar la bolsita de desecante puesto que sólo sirve para preservar el test de la humedad y no se emplea en la realización del test.
4. Romper el extremo superior del vial.
5. Añadir 4 ó 5 gotas en la zona para la muestra del dispositivo de re-

acción (ventana circular señalada con una flecha). No añadir partículas sólidas con el líquido.

6. Esperar no menos de 5 ni más de 10 minutos, leer e interpretar el resultado.

LECTURA DE RESULTADOS

NEGATIVO: Sólo aparece una línea transversal AZUL en la zona central de la tira de reacción alineada con la letra "C" (control) marcada en la carcasa. Siempre debe aparecer esta línea

POSITIVO: Además de la línea AZUL de control aparece otra línea ROJA/ROSA en la zona central de la tira de reacción alineada con la letra "T" marcada en la carcasa. La intensidad de esta coloración va a ser variable según la concentración presente de antígeno.

INVÁLIDO Si no aparece la línea azul, el test será INVÁLIDO porque no se ha procedido correctamente, porque los reactivos se han deteriorado o por haber añadido una cantidad incorrecta de muestra. Repita el test con un nuevo dispositivo de reacción.

Toda línea que por la naturaleza de la muestra pueda aparecer pasados 10 minutos no tendrá valor diagnóstico. El diagnóstico final no se debe basar sólo en el resultado de un test. Se deberá fundamentar en la correlación de los resultados del test con otros datos adecuados y con la sintomatología clínica.

CONTROL DE CALIDAD

Si no aparece ninguna línea azul el test es inválido, ya sea por que se realizó incorrectamente o por que los reactivos se han deteriorado. Repita el test preparando la muestra en cantidad adecuada.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El test debe usarse sólo para la detección de antígenos de Rotavirus en heces.
2. El test es cualitativo y no debe hacerse ninguna interpretación cuantitativa del resultado en relación directa a la intensidad de la línea positiva.
3. Mas de 200 muestras fueron evaluadas para asegurar el correcto funcionamiento del test. La correlación de resultados con otras técnicas (ELISA) fue excelente. Sin embargo, no se deben excluir interferencias en el funcionamiento del test.
4. Con un exceso de muestra pueden aparecer líneas marrones en vez de rojas. Estas líneas marrones no tienen ningún valor diagnóstico. En este caso se debe repetir el test con una cantidad menor de muestra o diluir el extracto ya hecho.
5. No se ha observado ninguna reacción cruzada con otros virus o sustancias durante la evaluación del test. Un resultado negativo no excluye totalmente una posible infección por Rotavirus.
6. El análisis de algunas muestras puede dar líneas con colores indefinidos, causados en la mayoría de los casos por muestras negativas. Cuando aparezcan estas líneas de coloración indefinida, debe repetirse el test. En el caso de obtenerse el mismo resultado se sugiere realizar el análisis con otro método analítico.

UMBRAL DE DETECCIÓN

A partir de multitud de ensayos con diferentes observadores en diferentes condiciones y con lotes distintos se observa que el test detecta sin problemas 16 ng/mL de proteínas víricas a los 5 minutos.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Se ha llevado a cabo un estudio comparativo del Stick Rotavirus frente a ELISA Ridascreen (de r-Biopharm, Darmstadt, Alemania). Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Rotavirus		101 muestras	OPERON	
			+	-
ELISA	+	11	11	0
Ridascreen	-	90	3	87

Sensibilidad	>99,9%
Especificidad	96,6%
Valor predictivo positivo	78,6%
Valor predictivo negativo	>99,9%

REPRODUCIBILIDAD

Precisión intraensayo

La precisión analizada con 10 ensayos a 8 concentraciones diferentes de antígeno posee una elevada reproducibilidad.

Precisión interdía Se ensayan 8 muestras de diferentes concentraciones durante 10 días obteniendo una elevada reproducibilidad y concordancia en todos los días analizados.

Precisión interlaboratorio

Tres laboratorios-operadores distintos ensayan las mismas muestras apreciando que el límite de sensibilidad de 16 ng/ml siempre es alcanzado.

Precisión interlote Se ensayan tres lotes distintos y en todos ellos se observa que alcanzan la sensibilidad asignada de 16 ng/ml.

BIBLIOGRAFÍA

- F. Bon et al. *Prevalence of a group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 1999, p. 3055-3058
- Bodo R. Eing et al. *Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of human rotaviruses in fecal specimens, Journal of Clinical Microbiology*, Dec. 2001, p.4532-4534
- Umesh D. Parashar et al. *Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children, Emerging Infectious Diseases*, vol. 9, No.5, May 2003, p. 565-572