
CERTEST

Rotavirus+

Norovirus GI/GII

ONE STEP

Rotavirus, Norovirus GI and

Norovirus GII

COMBO CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.



For information purposes only



CERTEST *Rotavirus+Norovirus GI/GII*

*One Step test to detect Rotavirus, Norovirus genogroup I and II in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de Rotavirus, Norovirus genogrupo I y II en formato cassette*

ENGLISH

INTENDED USE

CerTest *Rotavirus+Norovirus GI/GII* one step combo card test is a coloured chromatographic immunoassay for the simultaneous qualitative detection of *Rotavirus*, *Norovirus* genogroup I and II (GI and GII) in stool samples.

CerTest *Rotavirus+Norovirus GI/GII* combo card test offers a simple and highly sensitive screening assay to make a presumptive diagnosis of *Rotavirus* and/or *Norovirus* infection.

INTRODUCTION

Rotavirus, *Adenovirus* and *Astrovirus* are most common and major causes of severe gastroenteritis in infants and young children. Pattern also observed in adults. They are transmitted by faecal-oral contact. The main symptoms of viral gastroenteritis are watery diarrhoea and vomiting. The affected person may also have headache, fever and abdominal cramps ("stomach ache"). In general, the symptoms begin 1 to 2 days following infection with a virus that causes gastroenteritis and may last for 1 to 10 days, depending on which virus causes the illness (*Rotavirus* 3 days, *Adenovirus* 5-8 days and *Astrovirus* 3 days).

Noroviruses are the leading cause of epidemic gastroenteritis, including foodborne outbreaks, in the United States. *Noroviruses* belong to the family *Caliciviridae* and can be grouped into five genogroups (GI through GV), which are further divided into at least 34 genotypes. Genotypes GI, GII and GIV infect humans, causing gastroenteritis, whereas GIII and GV typically infect animals.

The symptoms of *Norovirus* related diseases are those typical of gastroenteritis that is, vomiting, watery diarrhea and abdominal cramps. Vomiting is a characteristic symptom in the majority of *Norovirus* infections (64% of adults and 81% of children). Other symptoms such as general malaise, low grade fever, nausea and fatigue are also present in over 90% of cases. The incubation period of the disease is generally between 12 and 48 hours, while infection lasts between 12 and 60 hours. Infection may also be asymptomatic, and thus contribute to the spread of the virus in the community. As a rule, the disease does not have serious consequences, and most patients recover within 1-2 days without complications. Debilitated patients and persons with weaker immune systems such as children, elderly or chronic patients may be affected by more serious forms of the disease. Specially, dehydration may represent a serious complication for children, the elderly and persons with a precarious metabolic balance or cardio circulatory instability.

TEST PRINCIPLE

CerTest *Rotavirus+Norovirus GI/GII* is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for the determination of *Rotavirus*, *Norovirus* GI and GII in stool samples.

Strip A consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against *Rotavirus* and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-*Rotavirus*) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

Strip B consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against *Norovirus* (genogroup I and II) and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-*Norovirus* (genogroup I and II)) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

If the sample is *Rotavirus* positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-*Rotavirus* monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip A, and if the sample is *Norovirus* genogroup I or II positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-*Norovirus* monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip B, which were previously pre-dried on the absorbent pad. The mixture then moves upward on the membrane, by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the binding conjugate complexes migrate. The anti-*Rotavirus* antibodies present on the membrane of strip A (test line) and the anti-*Norovirus* antibodies present on the membrane of strip B (test line) capture the coloured conjugate and the red line will be visible in both strips. These bands are used to interpret the result.

If the sample is negative, there is no *Rotavirus* and *Norovirus* (genogroup I and II) antigens presence and yet, the antigens may be present in a concentration lower than the detection limit value, for which the reaction will not take place with any red-coloured conjugate complex. The anti-*Rotavirus* and anti-*Norovirus* antibodies present on the membranes (test lines) will not capture the antigen-red-coloured conjugate complex (not formed), for which the red lines will not appear.

Whether the sample is positive or not, in both strips, the mixture continues to move across the membranes to the immobilized specific antibodies placed in the control lines. The anti-specific protein antibodies present on both membranes will capture control green-conjugate



complex and both control lines will always appear. The presence of these green lines serve as: 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable until the expiration date marked on its sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

PRECAUTIONS

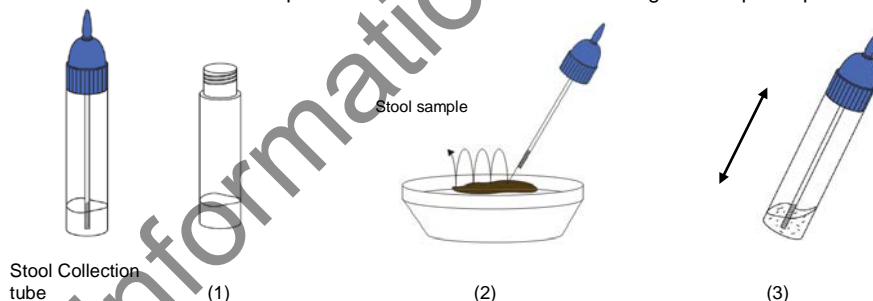
- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provided in the kit are approved for use in the CerTest *Rotavirus+Norovirus* GI/GII combo card test. Do not use any other commercial kit component.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool samples should be collected in clean containers. The samples can be stored in the refrigerator (2-8°C) for 1-2 days prior to testing. For longer storage, maximum 1 year, the specimen must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenise stool sample as thoroughly as possible prior to preparation.

Specimen preparation (see illustration):

1. Take out the cap of the stool collection tube (1) and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (2), to collect faecal sample (approx. 125mg) and add it to the stool collection tube. For liquid samples, add approx. 125µL in the stool collection tube using a micropipette.
2. Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3).



MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CerTest *Rotavirus+Norovirus* GI/GII combo card tests
- Instructions for use
- Stool collection tubes with diluent

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

TEST PROCEDURE

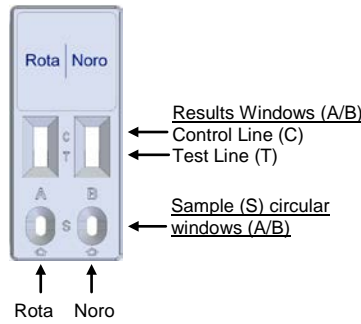
Allow tests, stool samples and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until the performance of the assay.

1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove CerTest *Rotavirus+Norovirus* GI/GII combo card test from its sealed bag just before using it.
3. Take the stool collection tube, cut the end of the cap (4) and dispense 4 drops in the circular window marked with the letter A (5) and 4 drops, using the same tube, in the circular window marked with the letter B (6). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

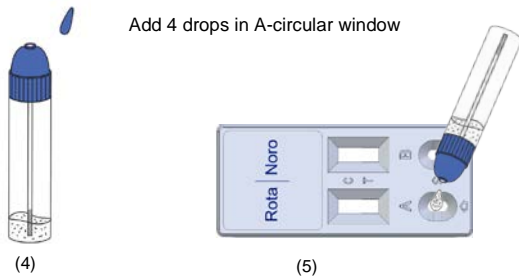
CERTEST *Rotavirus*+*Norovirus* GI/GII

*One Step test to detect Rotavirus, Norovirus genogroup I and II in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de Rotavirus, Norovirus genogrupo I y II en formato cassette*

If the test does not run due to solid particles, stir the sample added in the sample window (S) with the stick. If it doesn't work, dispense a drop of extraction diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.

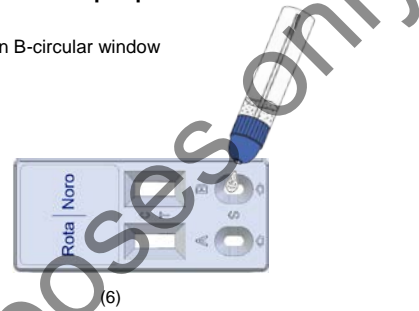


Rotavirus Strip A-procedure



Norovirus GI/GII Strip B-procedure

Add 4 drops in B-circular window



INTERPRETATION OF THE RESULTS (please refer to the illustration below)

- A: Green → Negative *Rotavirus*
B: Green → Negative *Norovirus* GI/GII
- A: Green/Red → Positive *Rotavirus*
B: Green/Red → Positive *Norovirus* GI/GII
- A: Green/Red → Positive *Rotavirus*
B: Green → Negative *Norovirus* GI/GII
- A: Green → Negative *Rotavirus*
B: Green/Red → Positive *Norovirus* GI/GII

INVALID RESULTS

-

	A (<i>Rotavirus</i>)	B (<i>Norovirus</i> GI/GII)	Interpretation of the results
1.	- GREEN	- GREEN	There is no <i>Rotavirus</i> and <i>Norovirus</i> presence. No viral infection caused by <i>Rotavirus</i> or <i>Norovirus</i> .
2.	+ GREEN-RED	+ GREEN-RED	There is <i>Rotavirus</i> and <i>Norovirus</i> presence. Viral infection caused by <i>Rotavirus</i> and <i>Norovirus</i> .
3.	+ GREEN-RED	- GREEN	There is <i>Rotavirus</i> presence. Viral infection caused by <i>Rotavirus</i> .
4.	- GREEN	+ GREEN-RED	There is <i>Norovirus</i> presence. Viral infection caused by <i>Norovirus</i> .
5.	Any other result	Any other result	Invalid result, either A or B, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.



CERTEST *Rotavirus+Norovirus GI/GII*

*One Step test to detect Rotavirus, Norovirus genogroup I and II in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de Rotavirus, Norovirus genogrupo I y II en formato cassette*

INVALID: Total absence of any control coloured line (GREEN) regardless the appearance or not of the test lines (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control lines failure. Review the procedure and repeat the assay with a new test. If the symptoms or situation still persist, discontinue using the test kit and contact your local distributor.

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured bands in the test lines (T) in the results windows will vary depending on the concentration of antigens present in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antigens can be determined by this qualitative test.

QUALITY CONTROL

Internal procedural controls are included in the test. The green lines appearing in the control lines (C) in the results windows are internal controls, which confirm sufficient specimen volume and correct procedural technique.

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening the sealed bag.
2. An excess of sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the diluent and repeat the test.
3. The intensity of test line may vary from very strong at high antigens concentration to faint when the antigens concentration is close to the detection limit value of the test.
4. After one week of infection, the number of viruses in faeces is decreasing, making the sample less reactive. Stool samples should be collected within one week of the onset of symptoms.
5. CerTest *Rotavirus+Norovirus GI/GII* should be used only with samples from human faeces. The use of other samples has not been established. The quality of the test depends on the quality of the sample; proper faecal specimens must be obtained.
6. Positive results determine the presence of *Rotavirus* and *Norovirus* (GI and/or GII) in faecal samples; nevertheless, a positive result should be followed up with additional laboratory techniques (biochemical methods, PCR or microscopy) to confirm the results. A confirmed infection should only be made by a physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated and must be based in the correlation of the results with further clinical observations.
7. A negative result is not meaningful because of it is possible the antigens concentration in the stool samples is lower than the detection limit value. If the symptoms or situation still persist, a *Rotavirus* and a *Norovirus* determination should be carried out with another technique (for example microscopy or PCR).

EXPECTED VALUES

Acute gastroenteritis is a common disorder in young children; moreover, the associated dehydration is a leading cause of admission to hospital in industrialized countries. Acute diarrhoea is a major health problem throughout the world and main source of mortality in developing countries. Enteric viruses have been recognized as the most significant etiological agents of the disease and yet, four categories of viruses are being considered clinically relevant: group A *Rotavirus* (family *Reoviridae*), *Norovirus* (family *Caliciviridae*), *Adenovirus* and *Astrovirus*. Several studies proved co-infections in infants 46% with acute watery diarrhoea.

In recent years, global public health concern caused by *Norovirus* was raised referring to significant morbidity and occasional mortality, which frequently occurred in schools, hospitals, cruises and other semi-closed institutions. The pathogen is highly contagious with a low infectious dose and spreads by ingestion of contaminated food and/or water or inhaling the agent particle by contact with patients. It has been deduced that approximately 90% of the outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in the United States were caused by *Norovirus* and 23 million cases were affected annually. In addition to human cost, *Norovirus* infections cause economic losses that approach or exceed \$650,000 in supplies and staff time off. Although previous studies showed the disease was mild and self-limiting, recent studies have showed its ability in causing more severe complications than previously expected.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical sensitivity and specificity

An evaluation, with faecal samples, was performed using an immunochromatographic test (CerTest *Rotavirus+Norovirus GI/GII*, CerTest) and these results were confirmed with commercial available tests (Ridascreen®*Rotavirus* ELISA Test, r-Biopharm) for *Rotavirus* and (Simple *Norovirus*, Operon) for *Norovirus GI/GII* and confirmed by PCR. The results were as follows:



CERTEST *Rotavirus+Norovirus* GI/GII

*One Step test to detect Rotavirus, Norovirus genogroup I and II in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de Rotavirus, Norovirus genogrupo I y II en formato cassette*

		Ridascreen® <i>Rotavirus</i> ELISA Test		
		+	-	Total
IC Test: CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Rotavirus</i>)	+	18	1	19
	-	0	43	43
	Total	18	44	62

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Rotavirus</i>) vs Ridascreen® <i>Rotavirus</i> ELISA Test	>99%	98%	>94%	>99%

		IC test: Simple <i>Norovirus</i>		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Norovirus</i> GI)	+	2	0	2
	-	0	48	48
	Total	2	48	50

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Norovirus</i> GI) vs Simple <i>Norovirus</i>	>99%	>99%	>99%	>99%

		PCR		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Norovirus</i> GI)	+	2	0	2
	-	0	48	48
	Total	2	48	50

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Norovirus</i> GI) vs PCR	>99%	>99%	>99%	>99%

		IC test: Simple <i>Norovirus</i>		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Norovirus</i> GII)	+	10	0	10
	-	0	48	48
	Total	10	48	58



CERTEST *Rotavirus+Norovirus* GI/GII

One Step test to detect *Rotavirus*, *Norovirus* genogroup I and II in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Rotavirus*, *Norovirus* genogrupo I y II en formato cassette

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Norovirus</i> GII) vs Simple <i>Norovirus</i>	>99%	>99%	>99%	>99%

		PCR		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Norovirus</i> GII)	+	8	0	8
	-	2	48	50
	Total	10	48	58

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Norovirus</i> GII) vs PCR	80%	>99%	>99%	96%

The results showed a high sensitivity and specificity to detect *Rotavirus*, *Norovirus* GI and *Norovirus* GII using CerTest *Rotavirus+Norovirus* GI/GII.

Cross reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of CerTest *Rotavirus+Norovirus* GI/GII; no cross reactivity against gastrointestinal pathogens occasionally present in faeces:

<i>Adenovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>Astrovirus</i>	Hepatitis A	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Norovirus</i> (Strip A)	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Entamoeba histolytica</i> (Strip A)	<i>Rotavirus</i> (Strip B)	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterovirus</i>	RSV (Strip B)	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i> O111 (Strip B)	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>



ESPAÑOL**USO PREVISTO**

CerTest *Rotavirus+Norovirus* GI/GII combo card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de *Rotavirus* y de *Norovirus* genogrupos I y II (GI y GII) en muestras de heces.

CerTest *Rotavirus+Norovirus* GI/GII combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de infección por *Rotavirus* y *Norovirus*.

INTRODUCCIÓN

Rotavirus, *Adenovirus* y *Astrovirus* son los agentes más frecuentes causantes de gastroenteritis en niños y jóvenes, también han sido detectados en adultos. Estos virus se transmiten por contacto feco-oral. Los principales síntomas de gastroenteritis vírica son diarrea acuosa y vómitos. También puede presentarse dolor de cabeza, fiebre y dolor de estómago. Por lo general, los síntomas comienzan 1 ó 2 días después de infectarse y pueden durar desde 1 hasta 10 días, dependiendo del virus causante de la enfermedad (3 días para *Rotavirus*, 5-8 días para *Adenovirus* y 3 días para *Astrovirus*).

Los *Norovirus* son la principal causa de gastroenteritis epidémica, incluyendo brotes de origen alimentario, en los Estados Unidos. Los *Norovirus* pertenecen a la familia Caliciviridae y se pueden agrupar en cinco genogrupos (desde GI a GV), que se dividen en al menos 34 genotipos. Los genotipos GI, GII y GIV infectan a los humanos, causando gastroenteritis, mientras que GIII y GV normalmente infectan a los animales.

Los síntomas de las enfermedades relacionadas con *Norovirus* son los típicos de la gastroenteritis, es decir, vómitos, diarrea acuosa y calambres abdominales. El vómito es un síntoma característico en la mayoría de las infecciones por *Norovirus* (ocurre en el 64 % de los adultos y el 81% de los niños). Otros síntomas como malestar general, náuseas, algo de fiebre y fatiga también están presentes en más del 90% de los casos. El período de incubación de la enfermedad es generalmente entre 12 y 48 horas, mientras que la infección dura entre 12 y 60 horas. La infección también puede ser asintomática, y por lo tanto contribuir a la propagación del virus en la comunidad. Como regla general, la enfermedad no tiene consecuencias graves, y la mayoría de los pacientes se recuperan en 1-2 días sin complicaciones. Los pacientes debilitados y las personas con sistemas inmunológicos débiles, como los niños, pacientes de edad avanzada o crónica pueden verse afectadas por las formas más graves de la enfermedad. Especialmente, la deshidratación puede representar una complicación grave para los niños, los ancianos y las personas con un balance metabólico o inestabilidad cardio circulatoria.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest *Rotavirus+Norovirus* GI/GII es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección cualitativa de *Rotavirus*, *Norovirus* GI y *Norovirus* GII en muestras de heces.

Tira A consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Rotavirus* en la línea de test (T), en la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Rotavirus*) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Tira B consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Norovirus* (genogrupo I y II) en la línea de test (T), de la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Norovirus* (genogrupo I y II)) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Si la muestra es *Rotavirus* positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-*Rotavirus*-microesferas rojas de látex) en la tira A, y si la muestra es *Norovirus* genogrupo I o II positiva, los antígenos de la muestra diluida de heces reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-*Norovirus*-microesferas rojas de látex) en la tira B, los cuales fueron secados previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-*Rotavirus* presentes en la membrana de la tira A (línea de test) y los anticuerpos anti-*Norovirus* presentes en la membrana de la tira B (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en ambas tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de *Rotavirus* ni de *Norovirus* (genogrupo I o II) o los antígenos están presentes en una concentración inferior al límite de detección y no se produce reacción con ningún complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-*Rotavirus* y

anti-Norovirus presentes en las membranas (líneas de test) no capturarán el antígeno-complejo coloreado rojo (no formado) y no aparecerán las líneas rojas.

Independientemente de que la muestra sea positiva o no, en ambas tiras, la mezcla continuará moviéndose a través de las membranas hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en las líneas de control. Estos anticuerpos anti-proteína específica presentes en ambas membranas capturarán el complejo conjugado de control y las líneas de control verdes siempre aparecerán. La aparición de estas líneas se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente, 2) que el flujo ha sido apropiado y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30°C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

PRECAUCIONES

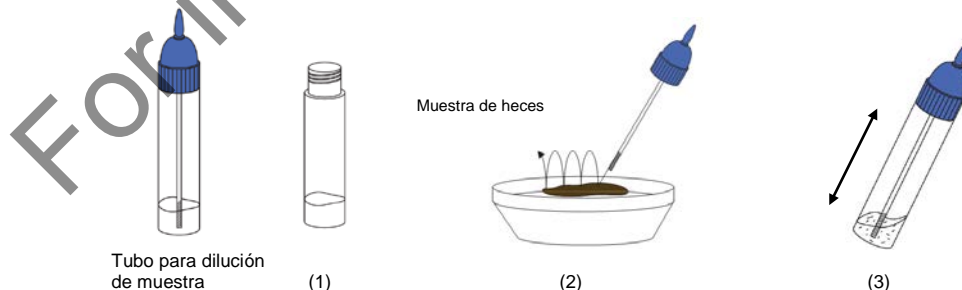
- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo test deberá utilizarse para cada muestra para evitar errores de contaminación.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con CerTest *Rotavirus+Norovirus* GI/GII combo card test. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se pueden conservar en frío (2-8°C), durante 1-2 días, hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 1 año, deben mantenerse congeladas a -20°C. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Preparación de la muestra (ver dibujo):

1. Abrir el tubo para dilución de muestra (1) y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se introducirá el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (2), tomando una cantidad de heces (aprox. 125mg) y posteriormente se introducirá la muestra en el tubo para dilución de muestra. Para muestras líquidas, añadida aprox. 125µL en el tubo para dilución utilizando una micropipeta.
2. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3).



MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest *Rotavirus+Norovirus* GI/GII combo card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos para dilución de muestra con diluyente

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

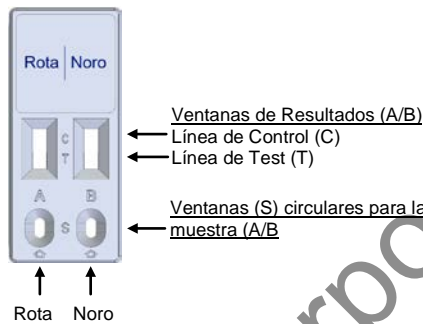
- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

Previamente los tests, las muestras de heces y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el tubo para dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest *Rotavirus+Norovirus GI/GII* de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el tubo para dilución de muestra, cortar la punta del tapón (4) y añadir 4 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (5), y añadir 4 gotas, con el mismo tubo, en la ventana circular marcada con la letra B (6), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos.

Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.



Procedimiento para la tira A de *Rotavirus*

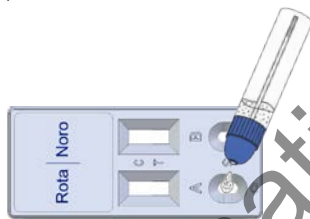
Añadir 4 gotas en la ventana circular (A)



(4)

Procedimiento para la tira B de *Norovirus GI/GII*

Añadir 4 gotas en la ventana circular (B)



(5)



(6)

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)

1.

A: Verde → Negativo *Rotavirus*
B: Verde → Negativo *Norovirus GI/GII*
2.

A: Verde/Rojo → Positivo *Rotavirus*
B: Verde/Rojo → Positivo *Norovirus GI/GII*
3.

A: Verde/Rojo → Positivo *Rotavirus*
B: Verde → Negativo *Norovirus GI/GII*
4.

A: Verde → Negativo *Rotavirus*
B: Verde/Rojo → Positivo *Norovirus GI/GII*

RESULTADOS INVÁLIDOS

- 5.

	A (Rotavirus)	B (Norovirus GI/GII)	Interpretación de los resultados
1.	-	-	No hay presencia de <i>Rotavirus</i> y <i>Norovirus</i> . No hay infección vírica causada por <i>Rotavirus</i> o <i>Norovirus</i> .
	VERDE	VERDE	
2.	+	+	Hay presencia de <i>Rotavirus</i> y <i>Norovirus</i> . Hay infección vírica causada por <i>Rotavirus</i> y <i>Norovirus</i> .
	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	
3.	+	-	Hay presencia de <i>Rotavirus</i> . Hay infección vírica causada por <i>Rotavirus</i> .
	VERDE-ROJO	VERDE	
4.	-	+	Hay presencia de <i>Norovirus</i> . Hay infección vírica causada por <i>Norovirus</i> .
	VERDE	VERDE-ROJO	
5.	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado	Cualquier resultado inválido, en A o en B, se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

INVÁLIDO: Cuando alguna línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezcan o no las líneas de test (ROJA). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: un volumen insuficiente de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisar el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si los síntomas o la situación persisten, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor.

OBSERVACIONES

La intensidad de las líneas de color rojo en las líneas de test (T) en las ventanas de resultados variará dependiendo de la concentración de antígenos presentes en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de antígenos pueden ser determinados por la misma.

CONTROL DE CALIDAD

Los controles internos de funcionamiento vienen incluidos en la prueba. Las líneas verdes que aparecen en las líneas de control (C) en las ventanas de resultados son los controles internos del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

- Una vez abierto, el test no debe usarse después de 2 horas.
- Un exceso de muestra de heces puede dar resultados erróneos, dando líneas no muy definidas de color pardo, que no tienen ningún valor diagnóstico. Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
- La intensidad de la línea de test puede variar desde muy fuerte a alta concentración de antígenos a débil cuando la concentración de antígenos está cerca del valor del límite de detección del test.
- Después de una semana de infección la presencia de virus eliminados en heces disminuye considerablemente por lo que es probable una menor concentración en la muestra. Se debe tomar la muestra de heces dentro de la primera semana de aparición de los síntomas.
- CerTest *Rotavirus+Norovirus* GI/GII debería utilizarse sólo con muestras de heces humanas. El uso de otras muestras no ha sido determinado. La calidad del test depende de la calidad de la muestra; por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras fecales.
- Los resultados positivos determinan la presencia de *Rotavirus* y *Norovirus* (GI y/o GII) en muestras de heces; sin embargo, un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio (métodos bioquímicos, PCR o microscopía) para confirmar los resultados. La infección debe confirmarse por un especialista o médico cualificado, tras evaluar las pruebas clínicas y los hallazgos de laboratorio teniendo en cuenta la correlación que puede existir con todas las observaciones clínicas.
- Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de antígenos en la muestra de heces sea inferior al valor del límite de detección. Si los síntomas o la situación persisten, para la determinación de *Rotavirus* y/o *Norovirus* se debería repetir la prueba con otras técnicas (por ejemplo microscopía o PCR).

VALORES ESPERADOS

La gastroenteritis aguda es un trastorno frecuente en niños pequeños, siendo la deshidratación que lleva asociada la principal causa de ingreso hospitalario en los países industrializados. La diarrea aguda es un problema de salud importante en todo el mundo y también una de las causas principales de mortalidad en los países en vías de desarrollo. Los virus entéricos han sido reconocidos como los agentes etiológicos más importantes de la enfermedad y estas cuatro categorías de virus están siendo considerados como los más relevantes clínicamente: el grupo A de *Rotavirus* (familia *Reoviridae*), *Norovirus* (familia *Caliciviridae*), *Adenovirus* y *Astrovirus*. En varios estudios, se ha demostrado la existencia de co-infecciones en el 46% de los niños con diarrea acuosa aguda.



CERTEST *Rotavirus+Norovirus* GI/GII

One Step test to detect *Rotavirus*, *Norovirus* genogroup I and II in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Rotavirus*, *Norovirus* genogrupo I y II en formato cassette

En los últimos años, se ha incrementado la preocupación por la salud pública mundial motivada por *Norovirus* ya que presentaba una significativa morbilidad y mortalidad ocasional, que con frecuencia se presentaba en colegios, hospitales, cruceros y otras instituciones semi-cerradas. El patógeno es altamente contagioso con una dosis infecciosa baja y se propaga por la ingestión de alimentos contaminados y / o agua o la inhalación de partículas de agente por el contacto con los pacientes. Se ha deducido que aproximadamente el 90% de los brotes de gastroenteritis no bacteriana aguda en los Estados Unidos fueron causados por *Norovirus* y 23 millones de casos se vieron afectados anualmente. Además del coste humano, las infecciones por *Norovirus* causan pérdidas económicas que se acercan o superan los 650.000\$ en suministros y bajas laborales. Aunque los estudios anteriores mostraron que la enfermedad era leve y autolimitada, estudios recientes han demostrado su capacidad para causar complicaciones más graves de lo previsto.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de heces, con un test inmunocromatográfico (CerTest *Rotavirus+Norovirus* GI/GII, CerTest) y estos resultados fueron comparados con los resultados obtenidos por dos tests comercializados (Ridascreen®*Rotavirus* ELISA Test, r-Biopharm) para *Rotavirus* y (Simple *Norovirus*, Operon) para *Norovirus* GI/GII y confirmados por PCR. Los resultados se muestran a continuación:

		Ridascreen® <i>Rotavirus</i> ELISA Test		
		+	-	Total
IC Test: CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Rotavirus</i>)	+	18	1	19
	-	0	43	43
	Total	18	44	62

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Rotavirus</i>) vs Ridascreen® <i>Rotavirus</i> ELISA Test	>99%	98%	>94%	>99%

		IC test: Simple <i>Norovirus</i>		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Norovirus</i> GI)	+	2	0	2
	-	0	48	48
	Total	2	48	50

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Norovirus</i> GI) vs Simple <i>Norovirus</i>	>99%	>99%	>99%	>99%

		PCR		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Rotavirus+Norovirus</i> GI/GII (<i>Norovirus</i> GI)	+	2	0	2
	-	0	48	48
	Total	2	48	50





CERTEST *Rotavirus+Norovirus GI/GII*

One Step test to detect *Rotavirus*, *Norovirus genogroup I and II* in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Rotavirus*, *Norovirus genogrupo I y II* en formato cassette

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest <i>Rotavirus+Norovirus GI/GII</i> (<i>Norovirus GI</i>) vs PCR	>99%	>99%	>99%	>99%

		IC test: Simple <i>Norovirus</i>		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Rotavirus+Norovirus GI/GII</i> (<i>Norovirus GII</i>)	+	10	0	10
	-	0	48	48
	Total	10	48	58

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest <i>Rotavirus+Norovirus GI/GII</i> (<i>Norovirus GII</i>) vs Simple <i>Norovirus</i>	>99%	>99%	>99%	>99%

		PCR		
		+	-	Total
IC test: CerTest <i>Rotavirus+Norovirus GI/GII</i> (<i>Norovirus GII</i>)	+	8	0	8
	-	2	48	50
	Total	10	48	58

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest <i>Rotavirus+Norovirus GI/GII</i> (<i>Norovirus GII</i>) vs PCR	80%	>99%	>99%	96%

Los resultados mostraron que CerTest *Rotavirus+Norovirus GI/GII* presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Rotavirus* y *Norovirus* genogrupo I y II.

Reacciones cruzadas

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas de test CerTest *Rotavirus+Norovirus GI/GII*; no se detectó reacción cruzada con patógenos gastrointestinales ocasionalmente presentes en las heces:

<i>Adenovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Hepatitis A</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Norovirus (Tira A)</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Entamoeba histolytica (Tira A)</i>	<i>Rotavirus (Tira B)</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterovirus</i>	<i>RSV (Tira B)</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i> O111 (<i>Tira B</i>)	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>



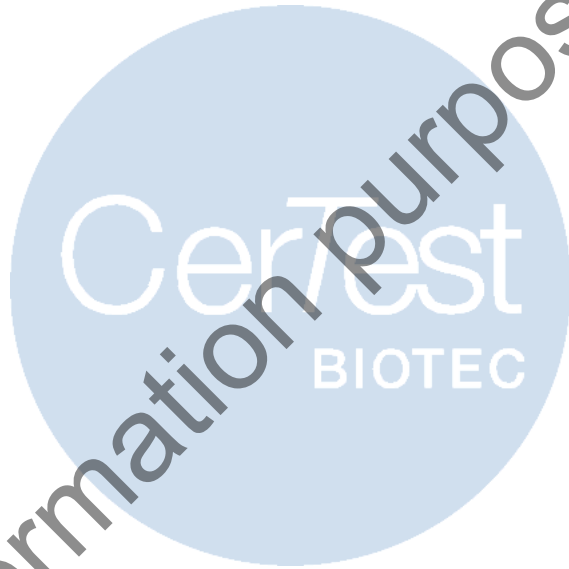
REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

1. CUKOR G., and BLACKLOW N. R., "Human Viral Gastroenteritis", Microbiological Reviews, Vol. 48 No 2, June 1984, pp. 157-179.
2. ESTES, M. K. and COHEN, J.; "Rotavirus Gene Structure and Function", Microbiological Reviews, Vol. 53 No 4, Dec. 1989, pp. 410-449.
3. PAI C. H., SHAHRABADI M. S., and INCE B., "Rapid Diagnosis of Rotavirus Gastroenteritis by a Commercial Latex Agglutination Test", Journal of Clinical Microbiology, Vol. 22 No 5, Nov. 1985, pp. 846-850.
4. CUKOR, G., PERRON, D.M., and BLACKLOW, N. R.: "Detection of Rotavirus in Human Stools by Using Monoclonal Antibody", Journal of Clinical Microbiology, Vol. 19, 888-892.
5. NEEL K. KRISHNA, B.A, "Identification of Structural Domains Involved in Astrovirus Capsid Biology", Viral Immunol. 2005; 18(1): 17-26.
6. BON, F. et al. "Prevalence of group A Rotavirus, human calicivirus, Astrovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France." J. Clin. Microbiol. 37 No 9 3055-3058 (1999).
7. LI-JUAN LIU, et al. "Identification of Norovirus as the Top Enteric Viruses Detected in Adult Cases with Acute Gastroenteritis". *Am. J. Trop. Med, Hyg*, 82(4), 2010, p. 717-722.
8. GIUSEPPINA LA ROSA, et al. "Recreational and drinking water as a source of norovirus gastroenteritis outbreaks: a review and update". *Environmental biotechnology* 4 (1) 2008, p. 15-24.
9. THOMAS R. FRIEDEN, et al. "Emergence of new norovirus strain GII.4 Sydney-United States, 2012". *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Rep.* 2013 Jan 25:62 (3):55.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS/SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

IVD <i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	Keep dry Almacenar en lugar seco	Use by Fecha de caducidad	Manufacturer Fabricante	LOT Batch code Número de lote
Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	Temperature limitation Limitación de temperatura	Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL Sample diluent Diluyente de muestra	REF Catalogue number Número de referencia

For information purposes only



CerTest
BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

