

#### USO

Dispositivo medico-diagnostico in vitro, su supporto immunocromatografico (card), per la determinazione rapida, qualitativa e simultanea di antigeni da Rotavirus e Adenovirus in campioni di feci umane, quale ausilio diagnostico nelle infezioni provocate da tali patogeni. ADENO-ROTA VIRUS COMBI è un rapido immunotest cromatografico, studiato per la ricerca simultanea di rotavirus e adenovirus in campioni di feci umane, in grado di fornire risultati in 10 minuti. Questo test impiega anticorpi specifici diretti contro antigeni di rotavirus e adenovirus per evidenziare selettivamente la presenza di rotavirus e adenovirus in campioni di feci umane.

#### PRINCIPIO del METODO

ADENO-ROTA VIRUS COMBI è un test qualitativo, immunocromatografico (flusso laterale) per la ricerca di antigeni da Rotavirus e Adenovirus in campioni di feci umane. La membrana cromatografica è presensibilizzata, rispettivamente, con anticorpi anti-rotavirus in corrispondenza della linea T2 e di anticorpi anti-adenovirus in corrispondenza della linea T1 (regioni reattive del test R e A). Durante la migrazione cromatografica il campione reagisce inizialmente con microparticelle rivestite con anticorpi anti-rotavirus e anticorpi anti-adenovirus. Questa miscela migra cromatograficamente lungo la membrana per azione capillare, reagendo con ulteriori anticorpi anti-rotavirus e anti-adenovirus adesi alla membrana generando linee di colore rosso. Lo sviluppo di queste linee colorate in corrispondenza delle regioni reattive T1 e T2 indica un risultato positivo, mentre la loro assenza indica un risultato negativo. Quale controllo procedurale interno deve SEMPRE svilupparsi una linea colorata in corrispondenza della regione C (controllo), ad indicare la corretta dispensazione del campione e l'avvenuta migrazione cromatografica nella membrana.

#### REAGENTI

Il supporto di reazione immunocromatografico (card) contiene particelle rivestite con anticorpi specifici anti-rotavirus e anti-adenovirus e anticorpi specifici anti-rotavirus e anti-adenovirus bloccati sulla membrana cromatografica.

Le provette (flaconi) di estrazione contengono una soluzione tampone specifica (tampone di estrazione, buffer)

#### PRECAUZIONI

1. Per uso esclusivo *in vitro*. Non utilizzare dopo la data di scadenza indicata.
2. Le cards devono rimanere sigillate prima di essere utilizzate: non impiegare reagenti che risultino danneggiati o non sigillati al momento dell'arrivo del kit.
3. Non utilizzare cards le cui membrane presentino bande colorate prima dell'inoculo del campione estratto.
4. Tutti i campioni biologici, le cards e tutti i monouso devono essere considerati potenzialmente infetti e, come tali, smaltiti secondo la normativa vigente.
5. Eliminare i reflui secondo le Normative di Legge. Non utilizzare il tampone qualora il flacone contenga precipitati visibili.
6. Non fumate, bere o mangiare durante l'esecuzione del test.
7. Indossare guanti protettivi: lavarsi le mani alla fine della seduta analitica.
8. L'umidità e la temperatura eccessiva possono inficiare i risultati analitici.
9. Portare tutto il materiale reagentario a T. A. prima della seduta analitica.

#### STABILITÀ DEI REAGENTI

Il kit deve essere conservato a 2-30°C. I supporti immunocromatografici (cards) sono sensibili all'umidità ed al calore eccessivo. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta e sul sacchetto sigillato contenente anche l'essiccante. NON CONGELARE. NON UTILIZZARE DOPO LA DATA DI SCADENZA INDICATA.

#### RACCOLTA del CAMPIONE

1. I campioni di feci dovrebbero essere raccolti al più presto dopo l'insorgenza della sintomatologia. Esistono evidenze che l'escrezione di rotavirus e adenovirus nelle feci di pazienti affetti da gastroenteriti è massima tra il 3 e il 5 giorno dall'insorgenza dei sintomi. La carica virale, infatti, decresce significativamente in seguito rendendo difficile una corretta diagnosi.
2. Il campione di feci deve essere raccolto in contenitore specifico, pulito e asciutto, privo di detergenti, conservanti o agar di trasporto.
3. Prima dell'analisi portare tutti reagenti a T.A.

#### MATERIALE A CORREDO

- Supporti di reazione (card)
- Provette di estrazione con buffer
- Contagocce
- Manuale d'istruzione

#### MATERIALE non a corredo

- Contendori specifici per campioni fecali
- Centrifuga e micropipetta in grado di dispensare 80 µl, qualora richiesti
- Timer

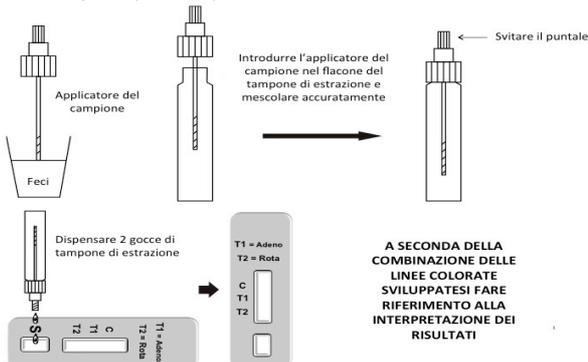
#### PROCEDURA ANALITICA

Prima dell'analisi portare tutti reagenti ed i campioni a T.A.

##### 1. Per la raccolta di campioni fecali

Raccogliere una quantità sufficiente di campione (1-2 mg o 1-2 ml in caso di campioni semiliquidi) nel contenitore specifico, in modo da ottenere una significativa concentrazione virale. I risultati migliori si ottengono qualora il test venga effettuato entro 6 ore dalla raccolta del campione, altrimenti possono essere conservati fino a 3 giorni a 2-8°C; per periodi maggiori di conservazione è necessario congelare i campioni a -20°C.

##### 2. Procedura operativa (vedi schema):



- **Per l'analisi di campioni fecali solidi:** Svitare il tappo del flacone contenente il tampone di estrazione (flacone di estrazione), evitando la fuoriuscita del liquido. Prelevare il campione immergendo la bacchetta applicatrice nel campione di feci (in almeno 3 punti diversi della massa fecale) e raccogliendo la quantità opportuna (30-50 mg.; approssimativamente equivalente a ¼ di pisello), senza rimescolare il campione con la bacchetta.
- **Per l'analisi di campioni fecali liquidi,** mantenendo il contagocce in posizione verticale, aspirare il campione fecale e dispensarne 2 gocce (circa 50 µl) nel flacone contenente il tampone di estrazione, preventivamente stappato.
- 3. Reinserrire la bacchetta applicatrice nel flacone, richiudendolo accuratamente: scuoterlo vigorosamente per assicurare una corretta omogeneizzazione
- 4. Rimuovere la card dal sacchetto sigillato, dopo averlo portato a T.A., ed utilizzarla entro 1 ora: i migliori risultati si ottengono se la card viene inoculata immediatamente
- 5. Spezzare la punta presente sul tappo del flacone di estrazione
- 6. Dispensare esattamente 2 gocce piene nella finestrella circolare presente sulla parte inferiore della card (pozzetto del campione, S). Fare molta attenzione a non introdurre particelle solide o bolle d'aria insieme al liquido.
- 7. Far partire il timer: incubare a T.A. per 10 minuti. Leggere i risultati. Non interpretare mai i risultati oltre i 20 minuti dall'inoculo.

**Nota:** qualora non si osservi migrazione cromatografica (ad esempio per la presenza di materiale particolato) centrifugare il campione estratto nel proprio tampone: raccogliere quindi 80 µl di sovratanante e dispensarlo nel pozzetto del campione (S) di una NUOVA CARD. Seguire le istruzioni al punto 7.

#### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

	<b>POSITIVO</b> <b>Positivo per Rotavirus:</b> si sviluppa una linea colorata in corrispondenza della regione del Controllo (C) e una ulteriore linea colorata in corrispondenza della regione del Test 2 (T2)
	<b>Positivo per Adenovirus:</b> si sviluppa una linea colorata in corrispondenza della regione del Controllo (C) e una ulteriore linea colorata in corrispondenza della regione del Test 1 (T1)
	<b>Positivo per Rotavirus &amp; Adenovirus:</b> si sviluppa una linea colorata in corrispondenza della regione del Controllo (C) e due ulteriori linee colorate in corrispondenza delle regioni del Test 1 e 2 (T1+T2)
	<b>NEGATIVO:</b> si sviluppa soltanto una linea colorata in corrispondenza della regione del Controllo (C) ma NON APPARE ALCUNA LINEA COLORATA in corrispondenza della regione del Test (T1 e/o T2)
	<b>NON VALIDO:</b> non si sviluppa la linea colorata in corrispondenza della regione del Controllo (C). Le possibili cause di un test non valido possono essere individuate in un inoculo di campione insufficiente o in una procedura analitica errata. Eseguire nuovamente il test utilizzando una NUOVA CARD, seguendo scrupolosamente tutte le fasi procedurali. Qualora il problema persista scartare il kit in uso e contattare il distributore.

#### CONTROLLO DI QUALITÀ

Il controllo procedurale è già presente sulla card (regione C- Controllo): la linea colorata del controllo deve sempre svilupparsi, quale verifica procedurale corretta. Materiale specifico per Controllo di Qualità Interno non viene fornito a corredo del kit; comunque si consiglia di eseguire il test utilizzando controlli negativi e positivi secondo la B.P.L., per verificare le caratteristiche analitiche del metodo e la sua corretta esecuzione

#### LIMITAZIONI del METODO

1. Il test è utilizzabile esclusivamente per la ricerca qualitativa dei rotavirus ed adenovirus in campioni fecali umani (non è possibile fornire risultati quantitativi in relazione all'intensità delle bande colorate). Per uso diagnostico esclusivo *in vitro*.
2. Il presente metodo può indicare esclusivamente la presenza di antigeni specifici di adenovirus e rotavirus nel campione fecale e non può essere utilizzato quale unico criterio clinico nella diagnosi di gastroenterite da adeno- o rotavirus.
3. Come tutti i test di laboratorio, l'interpretazione ai fini della diagnosi deve essere supportata da tutte le altre indagini necessarie ed informazioni cliniche
4. Qualora il test risulti negativo per entrambi i virus, ma la sintomatologia persista, si raccomanda di eseguire ulteriori tests specifici: un risultato negativo, infatti, non esclude totalmente una possibile infezione da rotavirus e/o adenovirus

#### VALORI ATTESI

ADENO-ROTA VIRUS COMBI è stato confrontato con il metodo dell'agglutinazione su lattice: è stata osservata una accuratezza complessiva >0,99%

#### PRESTAZIONI DEL METODO

##### Sensibilità, Specificità ed Accuratezza Cliniche

Le prestazioni analitiche di ADENO-ROTA VIRUS COMBI sono state valutate su 605 campioni clinici fecali provenienti da bambini ed adolescenti, testati in parallelo con il metodo dell'agglutinazione su lattice. I dati riportati nelle tabelle seguenti dimostrano che ADENO-ROTA VIRUS COMBI possiede un'elevata sensibilità e specificità per adeno- e rotavirus.

Metodo	Agglutinazione su lattice		Risultati totali	
	Risultati	Positivi		Negativi
Rotavirus (ADENO-ROTA VIRUS COMBI)	Positivi	191	2	193
	Negativi	0	168	
<b>Risultati totali</b>		191	170	361

Sensibilità relativa: >99,9% (98,4-100%)  
 Specificità relativa: 98,8% (95,8-99,9%)  
 Accuratezza: 99,4% (98,0-99,9%)  
 (\*Al 95% dell'intervallo di confidenza)

Metodo	Agglutinazione su lattice			Risultati totali
	Risultati	Positivi	Negativi	
Adenovirus (ADENO-ROTA VIRUS COMBI)	Positivi	60	1	61
	Negativi	0	183	183
	<b>Risultati totali</b>	60	184	244

Sensibilità relativa: >99,9% (95,1-100%)  
 Specificità relativa: 99,5% (97,0-100%)  
 Accuratezza: 99,6% (97,7-100%)  
 (\*Al 95% dell'intervallo di confidenza)

#### PRECISIONE

##### Intrasaggio

La precisione intrasaggio è stata determinata impiegando 10 replicati di sei campioni: un negativo, un basso positivo per rotavirus, un basso positivo per adenovirus, un medio positivo per rotavirus, un medio positivo per adenovirus, un alto positivo per rotavirus e un alto positivo per adenovirus. I campioni sono stati correttamente identificati nel 99% dei casi.

##### Intersaggio

La precisione intersaggio è stata determinata attraverso 10 saggi indipendenti dei medesimi 6 campioni: un negativo, un basso positivo per rotavirus, un basso positivo per adenovirus, un medio positivo per rotavirus, un medio positivo per adenovirus, un alto positivo per rotavirus e un alto positivo per adenovirus. I campioni sono stati correttamente identificati nel 99% dei casi.

#### CARATTERISTICHE DIAGNOSTICHE

Le patologie che provocano diarrea acuta rappresentano la maggior causa di morbidità infantile a livello mondiale e sono tra le principali cause di mortalità nei paesi in via di sviluppo.

Il rotavirus è il principale agente eziologico di gastroenteriti acute, soprattutto nei bambini<sup>2</sup>. Fu scoperto nel 1973 e la sua associazione con sindromi gastroenteriche infantili ha rappresentato un importante progresso negli studi sulle patologie gastroenterologiche acute non supportate da agenti batterici. L'infezione da rotavirus si trasmette per via oro-fecale e presenta un periodo di incubazione compreso tra 1 e 3 giorni.

Sebbene la raccolta del campione effettuata tra il secondo e il quinto giorno dalla comparsa della sintomatologia risulti ideale per il riscontro antigenico, il rotavirus può ancora essere identificato mentre perdurano le scariche diarroiche. Le gastroenteriti rotavirali rappresentano un elevato rischio di mortalità nelle popolazioni infantili, nell'anziano e nei pazienti immunodepressi<sup>3</sup>.

Nelle regioni temperate le infezioni da rotavirus insorgono prevalentemente nei mesi invernali: sono state descritte situazioni endemiche e epidemiche che riguardano alcune migliaia di soggetti<sup>4</sup>. In bambini ospedalizzati a causa di patologie gastroenteriche acute, fino al 50% dei campioni analizzati è stata riscontrata la presenza di rotavirus<sup>5</sup>. Il virus, che si replica nel nucleo della cellula infettata, tende a risultare specie-specifico per l'ospite e produce un *effetto citopatico caratteristico* (CPE).

Poiché il rotavirus è estremamente difficile da far crescere in coltura, l'isolamento del virus non è applicabile quale metodologia di Laboratorio per diagnosticarne l'infezione: pertanto sono state sviluppate diverse tecniche analitiche per la ricerca del rotavirus in campioni di feci.

La ricerca clinica ha dimostrato che adenovirus enterici, principalmente i tipi Ad40 e Ad41, rappresentano una delle principali cause di episodi di diarrea in bambini infettati, secondarie soltanto alle patologie gastroenteriche causate da rotavirus<sup>6,7,8,9</sup>.

Gli adenovirus sono stati isolati in tutto il mondo, e possono causare patologie diarroiche nei bambini durante tutti i mesi dell'anno. Le infezioni risultano più frequenti nei soggetti di età inferiore ai 2 anni, ma vengono riscontrate in tutte le fasce di età. Ulteriori studi hanno indicato che gli adenovirus sono associati al 4-15% di tutti i casi di gastroenteriti virali in soggetti ospedalizzati<sup>6,7,8,9</sup>.

Una rapida e accurata diagnosi di gastroenterite provocata da adenovirus è di notevole ausilio per stabilire l'eziologia della gastroenterite stessa e per allestire il relativo protocollo terapeutico.

Altre tecniche diagnostiche, quali la microscopia elettronica (ME) e ibridazione/amplificazione di acidi nucleici sono altamente dispendiose ed indagose ed inoltre, data la natura autolimitante delle infezioni da adenovirus, tali tecnologie analitiche non risulterebbero particolarmente utili.

#### CROSS-REATTIVITÀ

I batteri indicati sono stati testati alla concentrazione di  $1 \times 10^8$  organismi/ml e non hanno mai originato false/aspecifiche positività quando analizzati con il presente metodo.

<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococchi Gr. C</i>
<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Streptococchi Gr. B</i>
<i>Acinetobacter spp</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Branhamella catarralis</i>

#### BIBLIOGRAFIA

1. Wadell, G. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Principles and Practices. New York: Springer-Verlag, Volume II, 1988: 284-300.
2. WILHELM I, ROMAN E, SANCHEZ-FAUQUIER A. Viruses causing gastroenteritis. Clin Microbiol Infect. April. 2003, vol.9:247-262
3. Cubitt, WD (1982) Rotavirus Infection: An Unexpected Hazard in Units Caring for the Elderly. Geriatric Medicine Today 1: 33-38
4. Hung, T et al (1984) Waterborne outbreak of Rotavirus Diarrhoea in Adults in China caused by a Novel Rotavirus. Lancet, May 26;1(8387): 1139-1142
5. Cukor, G; Perron, DM; Hudson, R and Blacklow, NR (1984) Detection of Rotavirus in Human Stools by Using Monoclonal Antibody. J. Clin. Micro. 19: 888-892
6. Wood, D. J. and A. S. Bailey. "Detection of Adenovirus Types 40 and 41 in Stool Specimens by Immune Electron Microscopy." Journal of Medical Virology, 1987; 21: 191-199.
7. Nishio, Osamu, M. Ooseto, K. Takagi, Y. Yamasita, Y. Ishihara, and S. Isomura. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Employing Monoclonal Antibodies for Direct Identification of Enteric Adenoviruses (Ad40, 41) in Feces." Microbiol. Immunol. 1990; 34(10): 871-877.
8. Wood, D. J., K. Bijlsma, J. C. de Jong, and C. Tonkin. "Evaluation of a Commercial Monoclonal Antibody-Based Enzyme Immunoassay for Detection of Adenovirus Types 40 and 41 in Stool Specimens." Journal of Clinical Microbiology, June 1989; 27(6): 1155-1158.
9. Thomas, Eva. E., D. Roscoe, L. Book, B. Bone, L. Browne, and V. Mah. "The Utility of Latex Agglutination Assays in the Diagnosis of Pediatric Viral Gastroenteritis." Am. J. Clin. Pathol. 1994; 101:742-746.

#### Indice dei Simboli

	Attenzione, seguire le istruzioni per l'uso		Tests per kit		Rappresentante Autorizzato
	Per uso esclusivo "in vitro"		Utilizzare entro		Non riutilizzare
	Conservare a 2-30°C		Numero di Lotto	<b>REF</b>	N. Catalogo #
	Non utilizzare se la confezione è danneggiata				

Codici di Riordino:  
C-AD-RO10

10 determinazioni



Bio Plastic Sas - 00100 Roma