

**PASKIRTIS**

Greitas kokybinis chromatografinis Noroviruso nustatymas išmatose. Skirtas profesionaliam naudojimui in vitro diagnostikai.

**BENDRA INFORMACIJA**

Norovirusas (NoV) genetiškai skirtingų grupių pavienės ribonukleoninės rūgšties dalys priklausančios Kalikiviridajai šeimai. Taip pat jie vadinami ir „smulkios apvalios struktūros virusai“ (STVS) ir jų sistematika buvo nustatyta naudojant šiuolaikines molekulinės technologijas. Nustatyti keturi SRSV antigenų tipai, šiuo metu nustatyti trys Noroviruso genotipai. 1 ir 2 genotipai yra būdingi žmonių infekcijoms, 3 genotipas yra susijęs su jaučių ir kiaulių infekcijomis.

Norovirusas - ūmus gastroenteritas dažniausiai būdingas įvairioje darbo aplinkoje. Tai užkrečiama infekcija, kuria gali sukelti kelios patekusios dalelės. Užsikrečiama per maistą ar vandenį jį nurijus ar perduodama žmogaus žmogui. Ji perduodama fekaliniu-oraliniu būdu ar per orą. Infekcija yra ūminė, dažnai švelni, plintanti šeimos rate, dažnai vyresnio amžiaus. Inkubacinis periodas gali būti 24-48 valandos, kartais net 12 valandų. Šiuo virusu galima užsikrėsti maitinimo įstaigoje, ligoninėje, kitose viešuose vietose. Labai svarbu šią infekciją nustatyti ir gydyti kūdikius, vyresnio amžiaus ir silpnos sveikatos pacientus.

Noroviruso simptomai: pykinimas, vėmimas, diarėja, spazmai pilve. Taip pat pacientas gali pakilti aukšta temperatūra, krėsti šaltis, skaudėti galvą, skaudėti raumenis, jaustis bendras orgazmo nuovargis. Dažnai susergama staiga, simptomai jaučiami 1-2 dienas. Vėdimas žymiai labiau būdingas vaikams nei suaugusiems.

**REAKCIJOS PRINCIPAS**

Norovirusi nustatymas fekalijose – kokybinis viruso nustatymas žmogaus fekalijose. Tyrimo plokštelės membranos reakcijos zona yra dengta 1 ir 2 genotipo antikūnais prieš-norovirusą. Reakcijos eigoje mėginys reaguoja su dalelėmis dengtomis antikūnais prieš-norovirusą, susidaręs junginys membrana juda aukštyrą reaguodamas su antikūnais prieš-norovirusą, plokštelės tyrimo rezultato zonoje pasikeičia juostelės spalva. Juostelės spalvos pasikeitimas parodo teigiamą reakcijos rezultatą, o jei spalvos pasikeitimo nėra, tai neigiamas reakcijos rezultatas. Tyrimo kontrolei yra paruošta kontrolės zona plokštelės membranoje, ši spalvinė juosta turi atsirasti visose reakcijose ir parodo, kad tyrimo eiga yra teisinga, tyrimui naudojami tinkami reagentai ir mėginiai.

**REAGENTAI**

Plokštelė dengta 1 ir 2 genotipo antikūnų prieš-norovirusą dalelėmis ir membrana dengta antikūnais prieš norotavirusą.

**ĮSPĖJIMAI**

1. Skirta tik profesionaliam naudojimui in-vitro diagnostikai. Nenaudoti pasibaigus galiojimo laikui.
2. Plokštelę galima išpakuoti tik prieš tyrimą.
3. Darbo aplinkoje negalima valgyti, gerti, rūkyti.
4. Atliekant tyrimus būtina laikytis darbo su pavojingomis infekcijomis reikalavimų.
5. Tyrimo metu dėvėkite darbinį rūbą, pirštines, apsauginius akinius.
6. Utilizuojant laikykite bendros darbo laboratorijoje tvarkos.
7. Aplinkos drėgmė ir temperatūra gali įtakoti tyrimų rezultatus.

**LAIKYMAS IR STABILUMAS**

Rinkinys gali būti laikomas kambario temperatūroje 2-30° C temperatūroje. Tyrimo plokštelės stabilumas yra iki datos nurodytos ant pakuotės. Plokšteles išpakuokite tik prieš tyrimą. Negalima užšaldyti. Nenaudoti pasibaigusio galiojimo laiko reagentų.

**ĖMINIŲ SURINKIMAS**

- Tyrimų surinkimui tinkamiausiai ėminiai rinkti esant ūmiems atvejais. Buvo nustatyta, kad tinkamiausi šiems tyrimams ėminiai surinkti 3-13 ūminės infekcijos dieną. Jei ėminiai surenkami vėliau ir dar pasibaigus diarėjai, tai surinkto ėminio sudėtyje gali būti per maža rotaviruso koncentracija ir tyrimo rezultatas bus neigiamas.
- Ėminiai turi būti surenkami į švairius, sausus, sandarius indelius be detergentų, stabilizatorių ar transportinių terpių.
- Prieš naudojimą reagentai turi būti kambario temperatūros.

**RINKINIO SUDĖTIS**

- Tyrimo plokštelės/ar juostelės
- Mėginių surinkimo indeliai su ekstraciniu buferiu
- Naudojimo instrukcija, lašintuvas

**TYRIMAMS PAPILDOMAI REIKALINGOS PRIEMONĖS**

Atliekų kontaineris, chronometras, 80µl pipetės

**TYRIMO EIGA**

Prieš tyrimą visi reagentai turi būti kambario temperatūros 15-30° C.

1. Fekalių ėminio surinkimas: į švarų ir sausą indelį surinkite atitinkamą kiekį fekalijų (1-2ml, 1-2g). Rekomenduojamą tyrimą atlikti 6 valandų laikotarpyje po ėminio surinkimo. Prieš tyrimą ėminys gali būti laikomas šaldytuve 2-8° C temperatūroje 3 dienas, jei laikysite ilgiau šaldykite tai -20° C.

2. Mėginio paruošimas:

a) kietos fekalijos: nuimkite mėgintuvėlio dangtelį ir paimkite fekalijų iš trijų skirtingų ėminio vietų, viso apie 50mg, ėminio paėmimui naudokite ne šaukštelį, o lopetėlę.

b) skystos fekalijos: į mėgintuvėlį su ekstraciniu buferiu pipete perkelti apie 2 lašus (apie 50µl) fekalijų

3. Dangteliu uždenkite mėgintuvėlį ir viduje esantį skystį išmaišykite, taip paruošiamas skystas fekalijų mėginys. Palikite 2 minutes pastovėti.

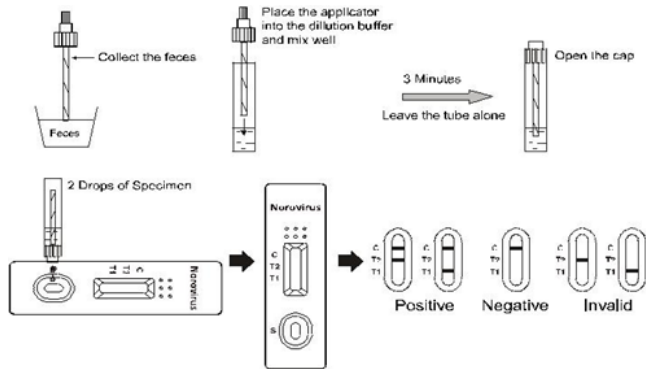
4. Tyrimo plokštelę prieš tyrimą išpakuokite iš hermetinės pakuotės ir rekomenduojama panaudoti valandos laikotarpyje.

Plokštelė turi būti kambario temperatūros. Išpakuotą plokštelę rekomenduojama panaudoti iš karto išpakavus.

5. Ant plokštelės į S langelį įlašinkite 2 lašus paruošto mėginio (80µl), venkite, kad nesusidarytu oro burbulai, fiksuokite reakcijos pradžią

6. Po 15 minučių įvertinkite reakcijos rezultatą. Praėjus 20 minučių rezultato nebegalima vertinti.

7. **Pastaba:** jei užlašintas mėginys nejuda membrana link reakcijos zonos, tai tyrimą būtina pakartoti prieš tai paruoštą mėginį nucentrifuguojant, tokiu atveju tyrimui panaudojama 80μ nucentrifuguoto supernatanto.



## REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

**T1 Teigiamas** : je atsiranda aiškio spalvotos 2 linijos: viena T1, t.y. genotipas 1 vertinimo zonoje, o kita kontrolės (C) zonoje

**T2 Teigiamas** : je atsiranda aiškio spalvotos 2 linijos: viena T2, t.y. genotipas 2 vertinimo zonoje, o kita kontrolės (C) zonoje

Pastaba: spalvos intensyvumas rezultato vertinimo zonoje parodo sukelėjo koncentraciją išmatose. Bet koks spalvos pasikeitimas tyrimo zonoje vertinamas kaip teigiamas rezultatas.

**Neigiamas** : jei tyrimo zonoje spalvinio pasikeitimo nėra, o kontrolės zonoje atsiranda 1 spalvota linija-juostelė, rezultatas neigiamas ir tinkamas vertinti.

**Klaidingas** : jei kontrolės zonoje ir/ar tyrimo zonoje spalvinio pasikeitimo nėra, tai rezultatas netinkamas vertinti. Tyrimą būtina pakartoti iš naujo.

## KOKYBĖS KONTROLĖ

Vidinė kokybės kontrolė yra integruota kiekviename tyrimo. Reakcija C – kontrolės zonoje parodo, kad tyrimas atliktas teisingai ir visi naudojami reagentai yra tinkami vartojimui.

Išorinė kokybės kontrolė neįeina į rinkinio sudėtį. Gera laboratorinė praktika rekomenduoja jas naudoti.

## TYRIMO APRIBOJIMAI

- Skirta in vitro diagnostikai. Gali būti naudojama tik noroviruso nustatymo tyrimams. Jei norima vertinti viruso koncentraciją, tai reikia atlikti kiekybinius tyrimus.
- Parodo noroviruso fekaliuose, vertinant galutinį rezultatą būtina įvertinti kitus tyrimus ir klinikinius duomenis.
- Tiriant kūdikius iki vieno metų galimi klaidingi teigiami rezultatai.
- Gavus neigiamą rezultatą, o klinikiniams simptomams esant teigiamiems būtina atlikti papildomus RT-PCR tęsinius tyrimus.

## LAUKIAMIE REZULTATAI

Tyrimų rezultatai naudojant šiuos rinkinius buvo palyginti su kitais komerciniais rinkiniais, rezultatų atitikimas 94,29%.

## PAGRINDINĖS CHARAKTERISTIKOS

Klinikinis jautrumas, specifiškumas ir tikslumas

Viso buvo ištirti vaikų ir jaunuolių 70 mėginiai, tyrimų rezultatai lyginti su rezultatais gautais tyrimams panaudojant RT-PCR metodą.

Tyrimo rezultatai parodė, kad santykinis šio tyrimo jautrumas 95,65%, o santykinis specifiškumas 91,67%.

### Noroviruso nustatymas plokštelėje metodo palyginimas su RT-PCR metodu

Metodas		RT-PCR agliutinacija		Bendri rezultatai
Noroviruso nustatymas plokštelėje	Rezultatai	Teigiama	Neigiama	
	Teigiama	44	2	46
	Neigiama	2	22	24
Bendri rezultatai		46	24	70
Santykinis jautrumas: 95,65 % (95%CI: 85,16%~99,57%)				
Santykinis specifiškumas: 91,67% (95%CI: 73,00%~98,97%)				
Tikslumas: 94,29% (95%CI: 86,01%~98,42%)				

### TIKSLUMAS vidinis

Šiam tyrimui buvo naudoti 10 mėginių replikos: neigiamos, silpnai teigiamos, teigiamos, stipriai teigiamos. Rezultatai atitiko >99%.

### TIKSLUMAS išorinis

Šiam tyrimui buvo naudoti 10 mėginių replikos: neigiamos, silpnai teigiamos, teigiamos, stipriai teigiamos. Rezultatai atitiko >99%.

### KRYŽMINĖS REAKCIJOS

Buvo vertinti reakcijų aktyvumai  $10 \times 10^9$  organizmų/ml. Šių organizmų reakcijos su norovirusu fekacijose gavosi neigiamos:

*Staphylococcus aureus*  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*Enterococcus faecalis*  
*Group C Streptococcus*  
*Klebsiella pneumoniae*  
*Branhamella catarrhalis*  
*Hemophilus influenzae*

*Neisseria gonorrhoea*  
*Group B Streptococcus*  
*Proteus vulgaris*  
*Enterococcus faecium*  
*Proteus mirabilis*  
*Candida albicans*  
*Neisseria meningitidis*

*Acinetobacter spp*  
*Salmonella choleraesuis*  
*Gardnerella vaginalis*  
*Acinetobacter calcoaceticus*  
*E.coli*  
*Chlamydia trachomatis*

## LITERATŪRA

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

## Simboliai

	Dėmesio		Produkto kodas
	Tik in vitro tikslais		Naudoti iki
	Saugoti tarp		Gamintojas
	Testų sk.		Vienkartiniam naudojimui