

RIDASCREEN® Rotavirus

REF C0901



1. Účel použití

Pro diagnostiku *in vitro*. Test RIDASCREEN® Rotavirus je enzymová imunoanalýza určená ke kvalitativní identifikaci rotavirů ve vzorcích lidské stolice.

2. Souhrn a vysvětlení testu

Rotaviry jsou významnými patogeny podílejícími se na nebakteriální gastroenteritidě u dětí ve věkové skupině od 6 měsíců do 3 let. Mohou být identifikovány také jako příčina onemocnění u starších dětí a dospělých. V rizikových skupinách – děti, starší osoby a imunosuprimovaní pacienti – mohou být tyto infekce fatální.

Rotavirové infekce se vyskytují zejména v zimních měsících. Byly popsány také endemie i epidemie s několika tisíci pacienty. U hospitalizovaných dětí s akutní enteritidou je až 50 % vyšetřených vzorků pozitivních na rotaviry. Rotaviry jsou přenášeny fekálně-orální cestou a jsou střevem vylučovány ve velkých množstvích, tudíž existují na novorozeneckých jednotkách a pediatrických klinikách obavy z nozokomiálních rotavirových infekcí, které je těžké léčit. To znamená, že aby bylo možné zabránit další infekci, je velmi důležitá spolehlivá metoda brzké identifikace rotavirů.

Rotaviry nebylo možné detekovat, dokud nebylo umožněno vyšetřování vzorků stolice a materiálu ze střevní biopsie pomocí elektronové mikroskopie, dnes už standardní identifikační metody. Další vývoj přinesl identifikaci *in vitro* v buněčné kultuře. Ta přesto není používána při rutinní identifikaci rotavirů, protože je těžká a časově náročná. Sérologické testy pomáhají pouze potvrdit diagnózu rotavirové enteritidy, protože IgM protilátky nejsou do 5. dne po začátku nemoci detekovatelné. Brzké stanovení diagnózy touto metodou je vyloučeno.

Test RIDASCREEN® Rotavirus je jednoduchá a vysoce senzitivní metoda enzymové imunoanalýzy, která brzy a spolehlivě identifikuje možné rotavirové antigeny. V kratším čase mohou být také zpracovány větší soubory vzorků.

3. Princip testu

Test RIDASCREEN® Rotavirus využívá monoklonální protilátky v sendvičové metodě. Povrch jamek na mikrotitrační destičce je potažen monoklonální protilátkou proti produktu 6. virového genu (VP6). Je to skupinově specifický antigen, který se nachází na všech *rotavirech*, které mohou způsobovat lidská onemocnění. Pomocí pipety je do jamky mikrotitrační destičky umístěna suspenze vyšetřované stolice, stejně jako kontrolní vzorky, spolu s biotinylovanými monoklonálními protilátkami proti rotaviru (konjugát 1) a inkubuje se při pokojové teplotě (20–25 °C). Po kroku promytí se přidá konjugát streptavidin polyperoxidázy (konjugát 2) a je znovu zahájena inkubace při pokojové teplotě (20–25 °C). Pokud je ve vzorku stolice přítomen rotavirus, vytvoří se sendvičový komplex složený z imobilizovaných protilátek, antigenů rotaviru a protilátek konjugovaných s komplexem biotin-streptavidin-peroxidáza. V dalším kroku promytí je odstraněn nepřichycený konjugát

streptavidin polyperoxidázy. Pokud je test pozitivní, změni navázaný enzym po přidání substrátu barvu předtím bezbarvého roztoku v jamkách mikrotitrační destičky na modrou. Přidání zastavovacího činidla změni barvu z modré na žlutou. Extinkce je přímo úměrná koncentraci rotavirů nacházejících se ve vzorku.

4. Dodávaná činidla

Činidla v kitu vystačí na 96 stanovení.

Plate	96	Mikrotitrační destička, 12 mikrotitračních stripů (které mohou být odděleny) v držáku na stripy; potaženo monoklonálními (myšími) protilátkami proti rotaviru
Diluent 1	100 ml	Roztok k ředění vzorků, roztok NaCl pufovaný proteiny; připraveno k použití, modře obarveno
Wash buffer	100 ml	Promývací roztok, roztok NaCl pufovaný fosfáty (10x koncentrovaný); obsahuje 0,1% thimerosal
Control +	2 ml	Pozitivní kontrola; kultura inaktivovaných rotavirů; připraveno k použití
Control -	2 ml	Negativní kontrola (roztok k ředění vzorků); připraveno k použití
Conjugate 1	13 ml	Monoklonální protilátky (myší) proti rotaviru konjugované s biotinem ve stabilizovaném proteinovém roztoku; připraveno k použití, červená barva
Conjugate 2	13 ml	Konjugát streptavidin polyperoxidázy ve stabilizovaném proteinovém roztoku; připraveno k použití, oranžová barva
Substrate	13 ml	Peroxid vodíku / TMB; připraveno k použití
Stop	12 ml	Zastavovací činidlo; 1 N kyselina sírová; připraveno k použití

Nebezpečné látky jsou označeny v souladu s předpisy pro značení.

Podrobnosti uvádí bezpečnostní listy (SDS), které jsou k dispozici na stránkách www.r-biopharm.com.

5. Pokyny k uskladnění

Všechna činidla skladujte při teplotě 2–8 °C a používejte do data spotřeby vytištěného na příslušném štítku. Dodávaný naředěný promývací roztok skladujte při teplotě 2–8 °C a používejte maximálně 4 týdny. Je nutné, abyste zabránili mikrobiální kontaminaci. Po datu spotřeby již není platná záruka kvality.

Otevřete hliníkový obal pomocí nůžek, aniž byste u toho roztrhli těsnicí sponu. Veškeré nepotřebné mikrotitrační stripy neprodleně vraťte do hliníkového obalu a skladujte při teplotě 2–8 °C.

Bezbarvý substrát chraňte také před přímým světlem, aby se nerozložil nebo nezmodral vlivem autooxidace. Jakmile substrát zmodrá, nelze jej dále používat.

6. Potřebná činidla, která nejsou součástí dodávky

6.1 Potřebná činidla

K provedení testu RIDASCREEN® Rotavirus jsou potřebná následující činidla:

Činidla
Destilovaná nebo deionizovaná voda

6.2 Potřebné laboratorní vybavení

K provedení testu RIDASCREEN® Rotavirus je potřebné následující vybavení:

Vybavení
Testovací zkumavky
Jednorázové pipety (artikl č.: Z0001)
Vortex mixér (volitelný, viz 9.3)
Mikropipeta na objemy 50–100 µl a 1 ml
Odměrný válec (1000 ml)
Stopky
Promývačka mikrodestiček nebo multikanálová pipeta (300 µl)
Fotometr na mikrodestičky (450 nm; referenční filtr 620–650 nm)
Filtrační papír (laboratorní ubrousky)

7. Varování a bezpečnostní opatření

Pouze pro diagnostiku *in vitro*.

Tento test smí provádět výhradně vyškolený laboratorní personál. Dodržujte pokyny pro práci ve zdravotnických laboratořích. Vždy striktně dodržujte uživatelské pokyny pro tento test. Vzorky ani činidla nepipetujte ústy a zabraňte jejich kontaktu s poraněnou kůží a sliznicemi. Při práci se vzorky použijte ochranné pomůcky (vhodné rukavice, laboratorní plášť, ochranné brýle) a po dokončení testu si umyjte ruce. Nekuřte, nejezte ani nepijte v místech, kde se zpracovávají vzorky.

Podrobnosti uvádí bezpečnostní listy (SDS), které jsou k dispozici na stránkách www.r-biopharm.com.

Kit zahrnuje pozitivní kontrolu obsahující kulturu inaktivovaných rotavirů. Musíte s ní zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem v souladu s národními bezpečnostními předpisy, stejně jako se vzorky pacienta.

Promývací roztok obsahuje 0,1% thimerosal jako konzervační přípravek. Tato látka nesmí přijít do kontaktu s pokožkou ani sliznicemi.

Zajistěte správnou a zodpovědnou likvidaci všech činidel a materiálů po jejich použití. Při likvidaci dodržujte národní předpisy.

8. Odběr a uskladnění vzorků

Vzorek stolice musí být odebrán co nejdříve během prvních tří dnů po výskytu počátečních příznaků průjmu. Před použitím skladujte materiál pro test při teplotě 2–8 °C. Pokud nejsou vzorky použity pro test do 3 dnů, doporučujeme je skladovat při teplotě -20 °C a méně. Vyhněte se opětovnému zmrazování a rozmrazování vzorků. Po naředění vzorku stolice v roztoku k ředění vzorků v poměru 1 : 11 může být vzorek stolice skladován při teplotě 2–8 °C a použit do 3 dnů (Tab. 1).

Tab. 1: Uskladnění vzorků

Neředěné vzorky stolice		Ředěné vzorky stolice
2–8 °C	≤ -20 °C	2–8 °C
≤ 3 dny	> 3 dny	≤ 3 dny

Vzorky stolice a rektální výtěry nemají být odebírány do transportních nádob s obsahem transportního média s konzervačními přípravky, zvířecím sérem, kovovými ionty, oxidačním činidlem nebo detergenty, jelikož by mohlo dojít k interferenci s testem RIDASCREEN® Rotavirus. Pokud používáte rektální výtěry, ujistěte se, že je množství materiálu stolice pro test dostačující (přibližně 100 mg).

Sledování kontaktů by mělo zahrnovat testování vzorků stolice odebraných kontaktním osobám, které nevykazují klinické příznaky, aby byly rozeznány asymptomatické přenašeči.

9. Průběh testu

9.1 Obecné informace

Všechna činidla a mikrotitrační destička Plate musí před použitím dosáhnout pokojové teploty (20–25 °C). Mikrotitrační stripy se nesmí vyjmout z hliníkového obalu, dokud nedosáhnou pokojové teploty. Činidla před použitím důkladně promíchejte. Po použití skladujte mikrotitrační stripy (v utěsněném obalu) a činidla opět při teplotě 2–8 °C. Použité mikrotitrační stripy nelze znovu použít. Nepoužívejte činidla ani mikrotitrační stripy, pokud je balení poškozené nebo lahvičky protékají. Zabraňte přímému kontaktu vzorků se složkami kitu, abyste předešli zkřížené kontaminaci.

Test nesmíte provádět na přímém slunečním světle. Doporučujeme, abyste mikrotitrační destičku přikryli nebo přes ni umístili přilnavou fólií, a zabránili tak ztrátám odpařováním.

9.2 Příprava promývacího roztoku

Smíchejte 1 díl koncentrátu promývacího roztoku **Wash buffer** s 9 díly destilované vody. Předtím musí být pomocí zahřívání ve vodní lázni o teplotě 37 °C rozpuštěny případné krystaly přítomné v koncentrátu.

9.3 Příprava vzorků

Naplňte označenou testovací zkumavku 1 ml roztoku k ředění vzorků RIDASCREEN® **Diluent | 1**. Nasajte vzorek tekuté stolice (asi 100 µl) pomocí jednorázové pipety (artikl č. Z0001) těsně nad druhou značku a přidejte jej do roztoku v testovací zkumavce, abyste vytvořili suspenzi. Abyste vytvořili suspenzi z tuhého vzorku stolice, přidejte úměrné množství (asi 50–100 mg) špachtlí nebo jednorázovým inokulačním očkem.

Homogenizujte suspenzi stolice nasáváním jednorázovou pipetou nebo ji případně promíchejte ve vortex mixéru. Suspenzi nechte krátkou dobu (10 minut) stát, aby se usadily hrubé částice stolice, a tento vyčištěný supernatant suspenze stolice můžete přímo použít v testu. Pokud se postup provádí v automatickém systému ELISA, musí být supernatant bez částic. V tom případě je doporučeno centrifugovat na 2500 G po dobu 5 minut.

Upozornění: Vzorky stolice naředěné v **Diluent | 1 mohou být testovány se všemi kity RIDASCREEN® ELISA, pro které se používá **Diluent | 1**.**

9.4 První inkubace

Po vložení dostatečného počtu jamek do držáku stripů přidejte do jamek 100 µl pozitivní kontroly **Control | +**, negativní kontroly **Control | -** nebo suspenze vzorku stolice. Následně přidejte 100 µl protilátek konjugovaných s biotinem **Conjugate | 1** a promíchejte (jemným klepáním na okraj destičky); poté inkubujte 60 minut při pokojové teplotě (20–25 °C).

9.5 Promývání

Pečlivé promytí je důležité, aby bylo dosaženo správných výsledků. Postupujte tedy striktně dle návodu. Inkubovaná látka v jamkách musí být vyprázdněna do odpadní nádoby a likvidována v souladu s místními předpisy. Poté vyklepejte destičku na savý papír, aby se zbavila zbylé vlhkosti. Dále destičku pětikrát promyjte, pokaždé s 300 µl promývacího roztoku **Wash buffer**. Po každém promytí vyklepejte jamky na část savého papíru, která je stále suchá a nepoužitá, abyste se ujistili, že jsou jamky zcela prázdné.

Při použití promývačky destiček nebo plně automatického systému ELISA se ujistěte, že je přístroj správně nastaven. Pokud je to nutné, vyžádejte si nastavení od výrobce. Přístroje dodávané společností R-Biopharm jsou již naprogramovány s platným nastavením a pracovními protokoly. Abyste se vyhnuli ucpání promývacích jehel, používejte pouze suspenze stolice bez částic (viz položka 9.3, Příprava vzorků). Také se ujistěte, že byla během každého kroku promývání nasáta veškerá tekutina.

9.6 Druhá inkubace

Pomocí pipety naplňte jamky 100 µl konjugátu streptavidin polymerázy **Conjugate 2**, potom inkubujte 30 minut při pokojové teplotě (20–25 °C).

9.7 Promývání

Promyjte, jak je popsáno v položce 9.5.

9.8 Třetí inkubace

Naplňte všechny jamky 100 µl substrátu **Substrate**. Poté destičku inkubujte 15 minut ve tmě při pokojové teplotě (20–25 °C). Následně naplňte všechny jamky 50 µl zastavovacího činidla **Stop**, čímž reakci zastavíte. Po opatrném promíchání lehkým klepáním na okraji destičky změřte extinkci při 450 nm (volitelné: 450/620 nm).

Upozornění: Vysoce pozitivní vzorky pacienta mohou vytvořit černě zbarvené sraženiny substrátu.

10. Kontrola kvality – známky nestability nebo zkažení činidel

Pro účely kontroly kvality musí být pokaždé při provádění testu použita pozitivní a negativní kontrola, aby byla zajištěna stabilita činidel a správné provedení testu. Test byl proveden správně, pokud je míra extinkce (OD) negativní kontroly méně než 0,2 při 450 nm (méně než 0,160 při 450/620 nm) a hodnota pro pozitivní kontrolu je větší než 0,8 při 450 nm nebo při 450/620 nm. Hodnoty negativní kontroly větší než 0,2 (0,160) mohou naznačovat, že bylo promytí nedostatečné. Odchylka od požadovaných hodnot, stejně jako zakalení nebo modré zbarvení bezbarvého substrátu před jeho přidáním do jamek, může znamenat, že jsou činidla proexpirovaná.

Pokud nejsou dosaženy stanovené hodnoty, musí být před opakováním testu zkontrolovány následující body:

- datum spotřeby použitých činidel;
- funkčnost použitého vybavení (např. kalibrace);
- správný průběh testu;
- vizuální kontrola kontaminace nebo úniku u složek kitu; roztok substrátu, který zmodral, se už nesmí použít.

Pokud nejsou podmínky po zopakování testu stále dosaženy, obraťte se na výrobce nebo svého místního distributora společnosti R-Biopharm.

11. Hodnocení a interpretace

11.1. Výpočet hodnoty cut-off

Aby byla stanovena hodnota cut-off, je ke změřené extinkci negativní kontroly přidáno 0,15 jednotky extinkce.

$$\text{Cut-off} = \text{extinkce negativní kontroly} + 0,15$$

11.2. Výsledky testu

Hodnocení vzorku je pozitivní, pokud je míra extinkce o více než 10 % vyšší než vypočítaná hodnota cut-off.

Hodnocení vzorku je hraniční, pokud je míra extinkce v rozmezí o 10 % nižší až o 10 % vyšší než hodnota cut-off. Pokud opakované vyšetření čerstvého vzorku stolice opět spadá do šedé zóny, vyhodnocení vzorku je negativní.

Vzorky s extinkcí více než 10 % pod vypočítanou hodnotou cut-off jsou považovány za negativní.

12. Omezení metody

Test RIDASCREEN® Rotavirus identifikuje antigeny rotaviru ve vzorcích stolice. Není možné spojovat stanovenou úroveň extinkce s výskytem nebo závažností klinických příznaků. Získaný výsledek je vždy nutné interpretovat v kombinaci s klinickými známkami a příznaky.

Pozitivní výsledek nevylučuje přítomnost jiných infekčních patogenů.

Negativní výsledek nevylučuje možnost infekce *rotaviry*. Takový výsledek se může vyskytnout z důvodu intermitentní exkrece viru nebo příliš malého množství antigenu ve vzorku. Pokud anamnéza pacienta podporuje podezření na infekci *rotaviry*, mělo by být vyšetření zopakováno s jiným vzorkem stolice.

Hraniční výsledek může být způsoben nehomogenním rozdělením virů ve vzorku stolice. V tomto případě by mělo být vyšetření zopakováno s druhou suspenzí stejného vzorku stolice nebo by měl být vyžádán druhý vzorek stolice.

13. Charakteristiky provedení

13.1 Kvalita testu

Test RIDASCREEN® Rotavirus byl ověřen srovnáním se třemi komerčními kity ELISA na rotavirus. Použité odebrané vzorky se skládaly z čerstvých vzorků z daného dne, odebraných rutinním laboratorním procesem, a z připravených vzorků, které byly v předstihu zamrazeny na teplotu -20 °C k použití ve srovnávací studii. Každým kitem ELISA byla dle pokynů výrobců testována jedna výchozí homogenní suspenze. Vzorek byl považován za pozitivní nebo negativní, pokud souhlasil výsledek dvou ze tří referenčních testů. Výsledky této studie jsou shrnuty v Tabulce 2.

Tab. 2: Korelace mezi testem RIDASCREEN® Rotavirus ELISA a třemi jinými komerčními kity ELISA

RIDASCREEN® Rotavirus	Konkurenční kit ELISA		Celkem
	+	-	
+	22	1*	23
-	1*	112	113
Celkem	23	113	136

* Oba vzorky byly negativní v PCR testu rotavirů.

Senzitivita: 95,7 % Specificita: 99,1 %

13.2 Zkřížená reaktivita

Testem RIDASCREEN® Rotavirus ELISA byla vyšetřena rozmanitá škála patogenních mikroorganismů z intestinálního traktu a nebyla shledána zkřížená reaktivita.

Tyto studie byly provedeny s bakteriálními suspenzemi vykazujícími koncentrace 10^6 až 10^9 organismů na ml. Jsou zde uvedeny supernatanty virových kultur a toxiny, stejně jako vzorky stolice. Výsledky této studie jsou shrnuty v Tabulce 3.

Tab. 3: Zkřížená reaktivita s patogenními mikroorganismy

Organismus	Původ	Zdroj	[OD 450 nm] střední hodnota
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	Kultivace	DSM 2403	0,078
<i>Aeromonas hydrophila anaerogenes</i>	Kultivace	DSM 30020	0,068
<i>Aeromonas hydrophila hydrophila</i>	Kultivace	DSM 30016	0,078
<i>Citrobacter sp.</i>	Kultivace	DSM 30047	0,055
<i>Citrobacter freundii</i>	Kultivace	DSM 30039	0,090
<i>Enterobacter cloacae</i>	Kultivace	DSM 30054	0,072
<i>Enterococcus faecalis</i>	Kultivace	DSM 2570	0,066
<i>Enterococcus faecium</i>	Kultivace	DSM 20477	0,095
<i>E. coli</i>	Kultivace	LMU Munich	0,069
<i>E. coli</i>	Kultivace	LMU Munich	0,082
<i>E. coli</i>	Kultivace	LMU Munich	0,083
<i>E. hermannii</i>	Kultivace	DSM 4560	0,054
<i>Lactococcus lactis</i>	Kultivace	DSM 20481	0,073
<i>Listeria innocua</i>	Kultivace	DSM 20649	0,078
<i>Proteus mirabilis</i>	Kultivace	DSM 788	0,053
<i>Proteus mirabilis</i>	Kultivace	DSM 4479	0,065
<i>Proteus vulgaris</i>	Kultivace	DSM 30119	0,053
<i>Providencia stuartii</i>	Kultivace	DSM 6676	0,080
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kultivace	DSM 939	0,065
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kultivace	DSM 4358	0,061
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kultivace	DSM 50124	0,082
<i>Pseudomonas putida</i>	Kultivace	DSM 291	0,058
<i>Salmonella agona</i>	Kultivace	LMU Munich	0,097
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Kultivace	DSM 4224	0,088
<i>Salmonella infantis</i>	Kultivace	LMU Munich	0,059
<i>Salmonella ohio</i>	Kultivace	LMU Munich	0,061
<i>Salmonella typhimurium</i>	Kultivace	DSM 554	0,052
<i>Serratia liquefaciens</i>	Kultivace	DSM 4487	0,050
<i>Shigella flexneri</i>	Kultivace	DSM 4782	0,063
<i>Shigella sonnei</i>	Kultivace	DSM 5570	0,048
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kultivace	DSM 20372	0,063
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Kultivace	DSM 2134	0,078
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Kultivace	DSM 20662	0,079

<i>Streptococcus uberis</i>	Kultivace	DSM 20569	0,072
<i>E. coli</i> (O157:H-)	Kultivace	LMU Munich	0,097
<i>E. coli</i> (O116:H21)	Kultivace	LMU Munich	0,074
<i>E. coli</i> (O111:H-)	Kultivace	LMU Munich	0,084
<i>E. coli</i> (O22:H8)	Kultivace	LMU Munich	0,095
<i>E. coli</i> (O26:H11)	Kultivace	LMU Munich	0,086
<i>Candida albicans</i>	Kultivace	ATCC 10231	0,082
<i>Salmonella enteritidis</i>	Kultivace	DSM 9898	0,065
<i>Campylobacter jejuni</i>	Kultivace	DSM 4688	0,054
<i>Campylobacter coli</i>	Kultivace	DSM 4689	0,073
<i>Campylobacter fetus</i>	Kultivace	DSM 5361	0,064
<i>Helicobacter pylori</i>	Kultivace	DSM 4867	0,053
<i>Morganella morganii</i>	Kultivace	DSM 6675	0,053
<i>Astrovirus</i>	Kultivace supernatantu	Micromun	0,055
<i>Astrovirus</i>	Stolice	TU Dresden	0,080
<i>Adenovirus</i>	Kultivace supernatantu	Micromun	0,065
<i>Adenovirus</i>	Stolice	TU Dresden	0,061
Sonda <i>H. pylori</i>	Inaktivovaný lyzát <i>H. pylori</i>	Kontrola sady RIDASCREEN® <i>H. pylori</i> FemtoLab	0,082
<i>C. perfringens</i> 50 µg/ml	Toxoid	Kontrola sady <i>C. perfringens</i> Enterotoxin A	0,058
<i>Shigatoxin STX1</i>	Toxoid	Technologie toxinů	0,064
<i>Shigatoxin STX2</i>	Toxoid	Technologie toxinů	0,073
<i>C. sordellii</i>	Kultivace	tgcBiomics	0,060
<i>C. difficile</i>	Kultivace	VPI 1640	0,060
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Kultivace	Waterborne Inc.	0,052
<i>Campylobacter</i>	Stolice	Rutinní laboratoř	0,042
<i>Giardia lamblia</i>	Stolice	TI Berlin	0,037
<i>Entamoeba histolytica</i>	Stolice	TI Berlin	0,049
<i>Salmonella enteritidis</i>	Stolice	Rutinní laboratoř	0,066
<i>Sapovirus</i>	Stolice	TU Dresden	0,062

13.3 Přesnost

Opakovatelnost testu RIDASCREEN® Rotavirus ELISA byla testována s šesti referencemi reprezentujícími celé měřené rozmezí od slabě po silně pozitivní. K určení opakovatelnosti uvnitř analýzy bylo analyzováno 40 replikátů těchto referencí. Kit 1 byla analyzován referenčním standardem 1 (RS 1) a kity 2 a 3 byly analyzovány referenčním standardem 2 (RS 2). Byly určeny střední hodnoty a variační koeficienty (CV) pro všechny tři šarže.

K opakovatelnosti v rámci analýz byly v duplikátech analyzovány reference z deseti různých pracovních dnů ve dvou běžích denně. Měření byla provedena u tří šarží třemi technikami.

Opakovatelnost v rámci šarží byla určena pro dvě šarže (šarže 2 a 3). Výsledky této studie jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tab. 4: Opakovatelnost a přesnost testu RIDASCREEN® Rotavirus ELISA

Reference	Střední hodnota / CV(%)	Uvnitř analýzy			V rámci analýz			V rámci šarží
		Kit šarže 1 (RC 1)	Kit šarže 2 (RC 2)	Kit šarže 3 (RC 2)	Kit šarže 1 (RC 1)	Kit šarže 2 (RC 2)	Kit šarže 3 (RC 2)	Kit šarže 2–3
1	MV	2,279	2,116	2,300	2,206	1,902	2,035	1,968
	CV (%)	4,82 %	9,38 %	6,86 %	11,78 %	20,30 %	18,33 %	19,42 %
2	MV	1,318	1,311	1,535	1,642	1,273	1,389	1,331
	CV (%)	8,87 %	10,67 %	5,00 %	14,82 %	25,42 %	21,61 %	23,70 %
3	MV	1,265	1,184	1,517	1,483	1,117	1,219	1,168
	CV (%)	9,82 %	13,36 %	5,25 %	15,00 %	22,68 %	21,43 %	22,01 %
4	MV	0,837	0,660	0,853	1,116	0,710	0,781	0,745
	CV (%)	10,26 %	15,12 %	4,53 %	17,26 %	25,81 %	24,37 %	25,36 %
5	MV	0,658	0,544	0,670	0,738	0,548	0,607	0,578
	CV (%)	9,94 %	14,99 %	4,85 %	17,78 %	25,43 %	26,14 %	26,21 %
6	MV	0,373	0,298	0,509	0,532	0,386	0,435	0,411
	CV (%)	9,85 %	15,38 %	7,43 %	17,94 %	28,90 %	27,73 %	28,87 %

13.4 Analytická senzitivita

Limit detekce testu RIDASCREEN® Rotavirus ELISA byl určen pomocí sériového ředění vzorku stolice kvantifikovaného imunoelektronovou mikroskopií (IEM). Měření byla prováděna triplicitně na základě titru virů $10,6 \times 10^7$ částic/ml. Limit detekce byl stanoven na $6,63 \times 10^3$ virových částic/ml ve vzorku stolice. Výsledky sériové titrace jsou uvedeny v Tabulce 5. Berte na vědomí, že pozitivní hodnota OD kitu ELISA je

způsobena intaktními virovými částicemi, ale také fragmenty virů, které nejsou při IEM spočítány.

Tab. 5: Stanovení analytické senzitivity testu RIDASCREEN® Rotavirus ELISA

IEM	RIDASCREEN® Rotavirus	
	Virové částice/ml	Střední hodnota [OD 450]
5,3 x 10 ⁶	4,036	pozitivní
5,3 x 10 ⁵	4,043	pozitivní
2,65 x 10 ⁵	4 051	pozitivní
1,325 x 10 ⁵	4,060	pozitivní
0,663 x 10 ⁵	3,140	pozitivní
5,3 x 10 ⁴	2,022	pozitivní
2,65 x 10 ⁴	0,788	pozitivní
1,325 x 10 ⁴	0,451	pozitivní
0,663 x 10 ⁴	0,240	pozitivní
0,332 x 10 ⁴	0,124	negativní
0,165 x 10 ⁴	0,049	negativní

13.5 Interferující látky

Následující seznam obsahuje látky, u kterých nebyl v popsanych koncentracích zaznamenán vliv na výsledek testu, když byly přimíchány do *rotavirus* pozitivního a *rotavirus* negativního vzorku stolice.










Hleny	5,0 % w/w	Diklofenak	0,00263 % v/w
Lidská krev	5,0 % v/w	Cyklamát	5,0 % v/w
Síran barnatý	5,0 % w/w	Kombinace kyseliny stearové a palmitové	40 % w/w (1 : 1)
Loperamid	5,0 % w/w		
Pepto-Bismol	5,0 % v/w	Metronidazol 0,5% roztok	5,0 % v/w

14. Historie verze

Číslo verze	Kapitola a návrh
2017-04-20	Předchozí verze
2019-07-08	Obecná revize 4. Dodávaná činidla 8. Odběr a uskladnění vzorků 9.2. Příprava mycího roztoku 9.5 Promývání

15. Vysvětlení symbolů

Všeobecné symboly

	Pro diagnostiku in vitro
	Prostudujte si návod k použití
	Číslo šarže
	Použitelný do
	Skladovací teplota
	Číslo výrobku
	Počet testů
	Datum výroby
	Výrobce

Symboly specifické pro test

Plate	Mikrotitrační destička
Diluent 1	Roztok k ředění vzorků
Wash buffer	Promývací roztok
Control +	Pozitivní kontrola
Control -	Negativní kontrola
Conjugate 1	Konjugát 1
Conjugate 2	Konjugát 2
Substrate	Substrát
Stop	Zastavovací činidlo

16. Literatura

1. Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., and Brown, F.: Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology Supplement 2. Springer Verlag, New York, pp 140-144 (1992)
2. Estes, M.K. and Cohen, J.: Rotavirus Gene Structure and Function. Microbiological Reviews 53: 410-419 (1989)
3. Bishop, R.F., Davidson, G. P., Holmes, I.H. and Ruck, B.J.: Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. Lancet 1, 149-151 (1974)
4. Kapikian, A.Z., Yolken, R.H., Greenberg, H.B., Wyatt, R.G., Kalica, A.R., Chanock, R. M. and Kim, H.W.: Gastroenteritis viruses. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, 5th Ed., (1980) Lennette, E.H., Schmidt, N.J., Eds. Amer. Pub. Health Assoc., Washington, D.C., 927-996
5. Flewett, T.H. and Woode, G.N.: The Rotavirus. Arch. Virology 57, 1-23 (1978)
6. Steinhoff, M.C: Rotavirus: The first five years. J. Ped. 96, 611-622 (1980)
7. Blacklow, N.R. and Cukor, G.: Viral Gastroenteritis. New England Journal of Medicine 304, 397-406 (1981)
8. Wenman, W.M., Hinde, D., Feltham, S. and Gurwith, M.: Rotavirus Infection in Adults. Results of a Prospective Study. New England Journal of Medicine 301, 303-306 (1979)
9. Cubitt, W.D.: Rotavirus Infection: An Unexpected Hazard in Units Caring for the Elderly. Geriatric Medicine Today 1, 33-38 (1982)
10. Marrie, T.J., Spencer, H.S., Faulkner, R.S., Ethier, J. and Young, C.H.: Rotavirus Infection in a Geriatric Population. Arch. Intern. Med. 142, 313-316 (1982)

11. Coulson, B.S. and Holmes, I.H.: An Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Rotavirus in Faeces of Neonates. *J. Virol. Methods* 8, 165-179 (1984)
12. Hung, T., Wang, Ch., Fang, Z., Chou, Z., Chang, X., Liang, X., Chen, G., Yao, H., Chao, T., Ye, W., Den, S. and Chang, W.: Waterborne outbreak of Rotavirus Diarrhoea in Adults in China caused by a Novel Rotavirus. *Lancet*, 1139-1142 (1984)
13. Cukor, G., Perron, D.M., Hudson, R. and Blacklow, N.R.: Detection of Rotavirus in Human Stools by Using Monoclonal Antibody. *J. Clin. Microbiol.* 19, 888-892 (1984)
14. Herrmann, J.E., Blacklow, N.R., Perron, D.M., Cukor, G., Krause, P.J., Hyams, J.S., Bar-rett, H.J. and Ogra, P.L.: Enzyme immunoassay with Monoclonal Antibody Enzyme Immunoassay for Detection of Rotavirus in Stool Specimens. *J. Infect. Dis.* 152, 830-832 (1985)
15. Yolken, R.H.: Enzyme Immunoassays for the Detection of Infectious Antigens in Body Fluids: Current Limitations and Future Prospects. *Rev. Infect. Dis.* 4, 35-68 (1982)
16. Eing, B.R. *et al*: Evaluation of Two Enzyme Immunoassays for Detection of Human *Rota-viruses* in *Fecal Specimens*. *J. Clin. Microbiology* 12/2001 p. 4532-4534