

**INTENDED USE**

The CerTest Enterovirus is a one step coloured chromatographic immunoassay for the qualitative detection of Enterovirus (VP1 peptide) in stool samples. Enterovirus may cause a wide variety of pathological symptoms and enteroviral infections that affect especially young children. CerTest Enterovirus allows for early detection of enterovirus, that is very interesting in epidemiology.

**INTRODUCTION**

Enterovirus belong to the Picornaviridae family and are the smallest, non- enveloped viruses known to infect both humans and animals. The spread of enteroviral infections is mainly by the faecal-oral and oral-oral route, but also through direct contact with secretions from ophthalmic and dermal lesions. Water, food and soil contaminated by infected faeces are an exogenous infection source which creates many opportunities for the transfer of the infection, and cause an epidemic outbreak in a short period of time. The average incubation period for enteroviral contagious is from 3–10 to 30 days.

The virus, after replicating and breaking the gastrointestinal tract barrier, is transmitted via the blood stream to every organ of the body. Enterovirus reveal tropism towards organs like the heart, skin, and in particular the central nervous system. It has been proved that infected people excrete large quantities of the virus in faeces for a period of even 16 weeks.

Traditional division organizes this taxonomic group into the subgenera polioviruses, coxsackieviruses (group A, B), echoviruses and a group of enterovirus marked according to their serotype number (66–71 and newly identified 73–75, 77, 78). In 2003, the International Committee on Taxonomy of Viruses created a new taxonomy classification. Enterovirus henceforth were divided into 5 groups of species based on their molecular properties (HEV-A, HEV-B, HEV-C, HEV-D and poliovirus).

**PRINCIPLE OF THE TEST**

The CerTest Enterovirus is a qualitative immunochromatographic assay for the determination of Enterovirus (Coxsackievirus, Echovirus, Poliovirus, Enterovirus) in fecal samples. The membrane is pre-coated with mouse monoclonal antibodies, on the test band region, against viral antigens (VP1 peptide). This antibody reacts with an epitope on the VP1 peptide which is highly conserved within the Enterovirus group.

During testing, the sample is allowed to react with the coloured conjugate (anti-VP1 peptide mouse monoclonal antibodies-red microspheres) which was pre-dried on the test. The mixture then moves upward on the membrane by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the coloured particles migrate. In the case of a positive result the specific antibodies present on the membrane will capture the coloured conjugate. The mixture continues to move across the membrane to the immobilized antibody placed in the control band region, a GREEN coloured band always appears. The presence of this GREEN band serves as 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) as an internal control for the reagents.

**STORAGE AND STABILITY**

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

**PRECAUTIONS**

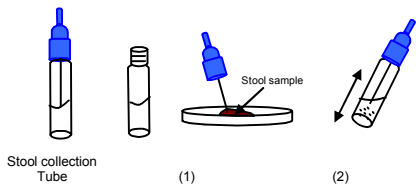
- For professional *in vitro* diagnostic use only.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.

**SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION**

Stool samples should be collected in clean containers and the assay should be done right after collection. The samples can be stored in the refrigerator (2-4°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.

**Specimen preparation (see illustration):**

- (1) Unscrew the cap and use the stick to pick up the sample (approx. 150mg), introduce the stick in 3 different parts of the sample; if the stool sample was liquid take 150 µL using a pipette, and add the sample into the stool collection tube.
- (2) Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion.



**MATERIALS PROVIDED**

- CerTest Enterovirus card test
- Instructions for use
- Stool collection tubes with sample diluent

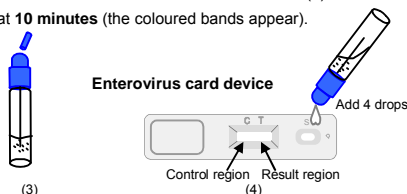
**MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED**

- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

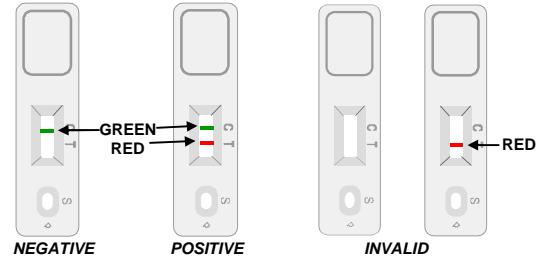
**TEST PROCEDURE**

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

1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion. Cut the end of the cap (3).
2. Remove the CerTest Enterovirus device from its sealed bag just before using.
3. Use a separate stool collection tube and device for each sample or control. Dispense 4 drops or 100 µL into the circular window marked with an arrow (4).
- 4.- Read the result at **10 minutes** (the coloured bands appear).



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



**NEGATIVE:** Only one GREEN band appears across the central window in the site marked with the letter C (control line). A negative result indicates no Enterovirus infection. A confirmed diagnosis should be made after all clinical and laboratory findings.

**POSITIVE:** In addition to the GREEN control band, a RED band (test line) also appears in the site marked with the letter T (result line). This result indicates a recent and contagious infection with Enterovirus.

**INVALID:** A total absence of the control coloured band (GREEN) regardless the appearance or not of the result line (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are the most likely reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the test with a new test. If the problem persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor.

**NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS**

The intensity of the red coloured band in the result line region (T) will vary depending on the concentration of antigens 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. A green line appearing in the control region (C) is an internal control. It confirms sufficient specimen volume and correct procedural technique. A clear background is an internal negative background control. If the test is working properly, the background in the result area should be clear and not interfere with the ability to read the result.

**LIMITATIONS**

1. The test must be carried out within 2 hours of opening the sealed bag.
2. An excess of stool sample could cause wrong results (brown bands appear).
3. After one month of infection, the number of viruses in feces is decreasing, making the sample less reactive. Stool samples could be collected previously to the onset of symptoms or also at 24-48 hours.
4. This test provides a presumptive diagnosis for Enterovirus group infections. A confirmed infection diagnosis should only be made by a physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated and should be determine the serotype of Enterovirus to established the type of disease.
5. If the patient has been recently vaccinated (for example against Poliovirus), it could appear a positive result.

**EXPECTED VALUES**

Negative results are expected in healthy adults. Infections caused by the Enterovirus are most likely to occur during the summer and fall.

**PERFORMANCE**

**Sensitivity and specificity**

It was studied 35 stool samples using CerTest Enterovirus and all of them were confirmed by IDEIA Enterovirus assay (Dako) and IMAGEN™ Enterovirus (Oxoid). The results showed >99% of sensitivity and >99% of specificity.

The antibodies used to elaborate this test recognise Enterovirus epitopes found in stool patients.

This preliminary values has to be taken with precaution until more evaluation data will be available.

**Cross-reactivity**

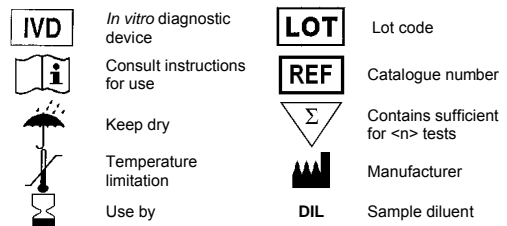
It was performed an evaluation to determine the cross reactivity of CerTest Enterovirus. There is not cross reactivity with other pathogen intestinal virus occasionally present in faeces:

- Rotavirus
- Adenovirus
- Astrovirus
- Hepatitis A
- Norovirus

**REFERENCES**

1. RAJTAR, B. et al. "Enteroviruses in water environment-a potential threat to public health". *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2008, No 15, p. 199-203.
2. BAEK, K. et al. "Molecular and Epidemiological Characterization of Enteroviruses Isolated in Chungnam, Korea from 2005-2006." *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 19(9), p. 1055-1064.

**SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS**





**CERTEST Enterovirus**  
Prueba de un solo paso en card para la detección del Enterovirus en heces

**USO PREVISTO**

CerTest Enterovirus es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa del Enterovirus (proteína VP1) en muestras de heces. Los Enterovirus pueden provocar una amplia variedad de síntomas y las infecciones enterovirales afectan de forma especial a los niños. CerTest Enterovirus permite una detección rápida de enterovirus, que resulta bastante interesante en epidemiología.

**INTRODUCCIÓN**

Enterovirus pertenecen a la familia Picornaviridae y son los virus más pequeños sin envoltura que se conocen que infectan tanto a personas como a animales. La transmisión se produce principalmente vía feco-oral y también boca a boca, pero puede producirse mediante contacto directo con secreciones provenientes de lesiones oftálmicas o dérmicas. El agua, comida y tierra contaminadas por heces infectadas son una fuente externa de infección que crea muchas oportunidades para la transmisión de la infección, y provocar un brote epidémico en poco tiempo. El periodo medio de incubación por contagio enterovirico, puede ser de 3-10 hasta 30 días.

El virus, tras su replicación y una vez que traspasa la barrera del tracto gastrointestinal, se trasmite vía torrente sanguíneo a cada órgano del cuerpo. Enterovirus presenta un tropismo hacia órganos diana como el corazón, la piel y el sistema nervioso central principalmente. Ha sido probado que una persona infectada puede excretar grandes cantidades de virus en un periodo que puede durar hasta 16 semanas.

La división tradicional clasifica este grupo taxonómico dentro del subgénero Poliovirus, Coxsackievirus (grupo A, B), Echovirus y un grupo de Enterovirus denominado según su número de serotipo (66-71, y los recientemente identificados 73-75, 77,78). En 2003, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus creó una nueva clasificación taxonómica. Dividieron los Enterovirus en 5 grupos de especies basándose en sus propiedades moleculares (HEV-A, HEV-B, HEV-C, HEV-D y Poliovirus).

**FUNDAMENTO DEL TEST**

CerTest Enterovirus es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la determinación de Enterovirus (Coxsackievirus, Echovirus, Poliovirus, Enterovirus) en muestras de heces. La membrana ha sido pre-fijada con anticuerpos monoclonales, en la zona del test, frente a antígenos víricos (proteína VP1). Este anticuerpo reacciona con un epítipo en el péptido VP1 el cual se mantiene ampliamente dentro del grupo de los distintos Enterovirus.

Durante la prueba, la muestra reacciona con los conjugados coloreados (anticuerpos monoclonales de ratón anti-péptido VP1 -microesferas rojas) previamente secados en el test. Este complejo avanza por capilaridad a través de la membrana del test. Para dar el resultado como positivo, una línea de color ROJO aparecerá en la zona de resultados de la membrana. La ausencia de esta línea sugiere un resultado negativo. Independientemente de que haya presencia o no del virus, la mezcla de conjugado va avanzando por la membrana hasta la región de control donde se han inmovilizado anticuerpos y siempre aparecerá una línea de color VERDE (línea de control). La aparición de esta línea se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente y 2) que el flujo ha sido el 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 la etiqueta. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

**PRECAUCIONES**

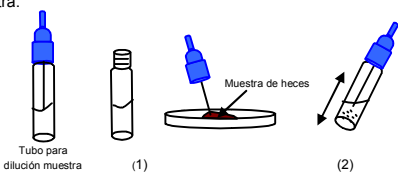
- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).

**RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN**

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio y la prueba debe realizarse lo más pronto posible después de la recogida. Las muestras se deben conservar en frío (sólo 1 ó 2 días a 2-4 °C) hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 1 año, deben mantenerse congeladas a -20°C. La muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. Homogeneizar la muestra de heces todo lo que sea posible antes de su preparación.

**Preparación de la muestra (ver dibujo):**

- (1) Desenroscar la tapa y con ayuda del palito se toma una muestra de las heces recogidas. Para ello se pasa el palito en la muestra en 3 zonas distintas de la misma recogiendo una pequeña cantidad de heces, si la muestra fuera líquida se tomarán 150 µL de la misma con una pipeta, introducir la muestra en el tubo para dilución.
- (2) Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitar para facilitar la dispersión de la muestra.



**MATERIALES SUMINISTRADOS**

- CerTest Enterovirus card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos para muestras con diluyente

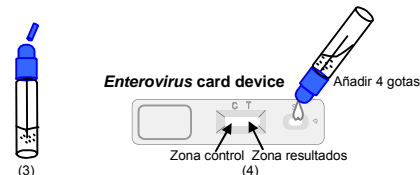
**MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS**

- Recipiente para la recogida de muestra de heces
- Guantes desechables
- Cronómetro

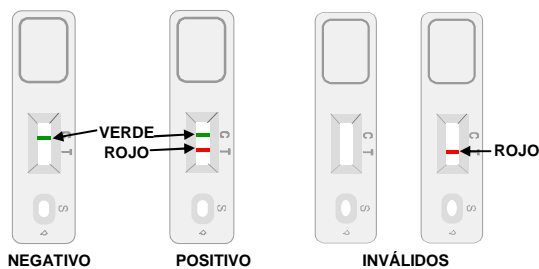
**PROCEDIMIENTO**

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

1. Agitar el tubo de dilución de la muestra para asegurar una buena dispersión. Cortar la punta del tapón (3).
2. Sacar el dispositivo de reacción CerTest Enterovirus de su envase para utilizarlo inmediatamente.
3. Para cada muestra o control se debe usar un tubo de dilución de la muestra y un dispositivo diferente. Tomar 4 gotas o 100 µL del líquido y depositarlas en la ventana circular marcada con una flecha o una S en el dispositivo (4).
4. Leer el resultado a los **10 minutos** (las líneas coloreadas aparecen).



**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**



**NEGATIVO:** Una sola línea de color VERDE aparece en la ventana central del dispositivo de reacción, en la zona marcada con la letra C (línea de control). Un resultado negativo indica que no hay infección por Enterovirus. Se debe hacer un diagnóstico confirmatorio para determinar este resultado tras valorar los hallazgos clínicos y de laboratorio.

**POSITIVO:** Además de la línea de control VERDE, también aparece una línea ROJA (línea de resultado) en la zona marcada con la letra T (zona de resultado). Este resultado indica una infección reciente y contagiosa de Enterovirus.

**INVÁLIDO:** Cuando la línea de control (VERDE) no aparece independientemente de que aparezca o no la línea de resultado (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 revisarse el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo dispositivo de reacción. Si persistiese el problema, debe contactar con su proveedor y dejar de utilizar la prueba.

**OBSERVACIONES**

La intensidad de la línea roja en la zona de resultado puede variar 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 puede ser determinada por la misma.

**CONTROL DE CALIDAD**

El control interno de funcionamiento viene incluido en la prueba. La línea verde que aparece en la zona de control (C) es el control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado. La claridad del fondo de la ventana es también un control interno. Si el test funciona correctamente, este fondo estará claro y no interferirá con la lectura del resultado.

**LIMITACIONES**

1. Una vez abierto, el dispositivo no debe usarse después de 2 horas.
2. Un exceso de muestra puede dar resultados negativos, dando líneas no muy definidas de color pardo que no tienen ningún valor diagnóstico.
3. Después de un mes de infección la presencia de virus eliminados en heces disminuye considerablemente por lo que es probable una menor concentración en la muestra. Se puede tomar la muestra de heces antes de aparecer los síntomas y tras 24-48 horas ya se detectaría como positivo.
4. Esta prueba diagnóstica una posible infección por algún virus del grupo Enterovirus, situación que debe confirmarse por un especialista o médico cualificado, teniendo en cuenta las pruebas clínicas y de laboratorio evaluadas y también debería determinarse el serotipo de Enterovirus implicado.
5. Si el paciente ha sido vacunado recientemente (por ejemplo frente a Poliovirus) podría dar un resultado positivo.

**VALORES PREVISTOS**

Se esperan resultados negativos en adultos libres de infección. Las infecciones provocadas por Enterovirus suelen aparecer durante el verano y el otoño.

**CARACTERÍSTICAS DEL TEST**

**Sensibilidad y Especificidad**

Se estudiaron 35 muestras de heces usando CerTest Enterovirus y todas las muestras fueron evaluadas mediante IDEIA Enterovirus assay (Dako) and IMAGEN™ Enterovirus (Oxoid). Los resultados mostraron >99% de sensibilidad y >99% de especificidad.

Los anticuerpos usados para la elaboración de este test reconocen epítipos de Enterovirus que se encuentran en las heces de los pacientes evaluados.

Estos primeros resultados deben ser valorados con precaución hasta que se disponga de más datos provenientes de distintas evaluaciones.

**Reacciones cruzadas**

Se realizó una evaluación para determinar la reacción cruzada de CerTest Enterovirus. No hay reacción cruzada con varios virus patógenos intestinales que están presentes en heces:

- Rotavirus
- Adenovirus
- Astrovirus
- Hepatitis A
- Norovirus

**BIBLIOGRAFÍA**

1. RAJTAR, B. et al. "Enteroviruses in water environment-a potential threat to public health" *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2008, No 15, p. 199-203.
2. BAEK, K. et al. "Molecular and Epidemiological Characterization of Enteroviruses Isolated in Chungnam, Korea from 2005-2006." *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 19(9), p. 1055-1064.

**SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO***



**CerTest** BIOTEC S.L. C/María de Luna 11, nave 16 E-50018 Zaragoza (SPAIN) www.cerTest.es