

**PROYECTO PARA LA
VIGILANCIA DE LA
DIARREA PRODUCIDA
POR ROTAVIRUS EN NIÑOS
MENORES DE CINCO AÑOS EN PARAGUAY**



MANUAL OPERATIVO



**Organización
Panamericana
de la Salud**

Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud



**MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y BIENESTAR SOCIAL
DIRECCION GENERAL DE VIGILANCIA DE LA SALUD**

MANUAL OPERATIVO

**PROYECTO PARA LA
VIGILANCIA DE LA
DIARREA PRODUCIDA
POR ROTAVIRUS EN
NIÑOS MENORES
DE CINCO AÑOS
EN PARAGUAY**

PARAGUAY 2004

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y BIENESTAR SOCIAL

Dr. Julio Cesar Velázquez Tillería

Ministro de Salud Pública y Bienestar Social

Dra. Wilma Dina Basualdo

Vice Ministra de Salud Pública y Bienestar Social

Dra. Teresa León Mendaro

Directora General de Vigilancia de la Salud

Dra. Gloria Celeste Samudio

Directora de Vigilancia de Enfermedades Transmisibles

Dr. Bq. Pedro Sachero Patiño

Director del Laboratorio Central de Salud Pública

Dr. Carlos Daniel Torres Amarilla

Director del Programa Nacional de Enfermedades Inmunoprevenibles y PAI

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD OPS/OMS

Dra. Carmen Rosa Serrano

Representante de la OPS/OMS en Paraguay

ELABORADO POR:

Norma Beatriz Coluchi Mareco, MSc.

Laboratorio Central de Salud Pública

Dra. Maria Angelica Barbosa Verdún

Dirección de Vigilancia de Enfermedades Transmisibles

Lic. Alba María Roperó A.

Consultora PAI

OPS/OMS

Dr. Ernesto Weber

Hospital Central del Instituto de Previsión Social

Dra. Delia Becker

Hospital General Pediátrico "Niños de Acosta Ñú"

COORDINADORES NACIONALES

Directora General de Vigilancia de la Salud

Dra. Teresa León Mendaro

Dirección de Vigilancia de

Enfermedades Transmisibles

- Dra. Gloria Celeste Samudio
- Dra. Maria Angelica Barbosa Verdún

Laboratorio Central de Salud Pública

- Dr. Bq. Pedro Sachero Patiño
- Norma Beatriz Coluchi Mareco, MSc.

APOYO TECNICO

Lic. Gladys Ghisays

Consultora PAI OPS/OMS Paraguay

Dr. Salvador García

Regional Advisor. OPS/OMS Washington DC

Dra. Reina Turcios

Centers for Disease Control and Prevention CDC

EXPERTOS QUE VALIDARON EL MANUAL

Dirección de Vigilancia de Enfermedades Transmisibles. MSP y BS:

- Dra. Mercedes Zaracho
- Dra. María Victoria Alé

Laboratorio Central de Salud Pública. MSP y BS:

- Dra. Natalie Weiler
- Dra. Miryam Morán
- Dra. María José Ortega

Hospital Nacional de Itauguá. MSP y BS:

- Lic. Domingo Avalos
- Dra. María Enilda Vega Bogado
- Dra. Gloria Gómez Duarte
- Dra. Raquel Lovera
- Dra. Marta Olmedo
- Dra. Susana Petit
- Dra. Viviana Pavlicich

Instituto de Medicina Tropical. MSP y BS:

- Dr. Roberto González
- Dra. Cinthia Díaz G.

Hospital General Pediátrico “Niños de Acosta Nú”. MSP y BS:

- Dra. Gloria Celeste Aguilar
- Dra. Lizette Heinichen
- Lic. Nancy Holt de Ortiz
- Lic. Carmen Toppi

Hospital Central. Instituto de Previsión Social:

- Dra. Marta Marecos
- Dra. Elba María Apud

APOYO FINANCIERO

**CHILDREN VACCINE PROGRAM
PROGRAM FOR APPROPRIATE TECHNOLOGY IN HEALTH**

CVP / PATH

)

PROYECTO PARA LA **VIGILANCIA DE LA DIARREA PRODUCIDA POR ROTAVIRUS EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS EN PARAGUAY**

MANUAL OPERATIVO

INDICE

	Página
Resumen Ejecutivo	11
Objetivos	11
Introducción	13
Definiciones Operativas	14
Colecta de muestras y datos	15
Flujograma de actividades y responsabilidades	18
Procedimientos para registrar, alicuotar y almacenar muestras	19
Detección de Rotavirus por ELISA-Dako	22
Registro y emisión de resultados	29
Control de Calidad	30
Indicadores de evaluación	30
Anexo 1	31
Anexo 2	46
Anexo 3	50

Edición
número: **1**

Revisión: **1ra.**

Fecha: **Abril, 2004**

1. Resumen Ejecutivo

En el marco de la Iniciativa Regional para la Vigilancia de Rotavirus en las Américas y con el soporte del Centro de Control de Enfermedades a través del Centro de Referencia Internacional para las Gastroenteritis Virales, la Unidad de Vacunas e Inmunización de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y el «Children Vaccine Program» del «Program for Appropriate Technology in Health» (CVP/ PATH), se están llevando a cabo actividades para la ejecución de proyectos de vigilancia de la diarrea producida por Rotavirus en niños menores de cinco años en varios países.

Para la estandarización de los estudios en cada país se utilizarán protocolos basados en el Protocolo Genérico de la OMS para la Conducción de Vigilancia de Rotavirus con la finalidad de simplificar las metodologías promoviendo la comparabilidad de los datos entre países, regiones y otros continentes. Estos esfuerzos tienen el propósito final de definir la epidemiología y estimar la carga por enfermedad de rotavirus en la región, preparar datos para la introducción de la vacuna y desarrollar una vigilancia que pueda ser utilizada para la evaluación del impacto de la vacuna cuando esta se encuentre finalmente disponible.

Se utilizan métodos estandarizados en relación a las siguientes definiciones: hospitalizaciones, definición de caso, detección de Rotavirus, caracterización del virus y utilización de servicios de salud.

El presente documento proporciona orientación sobre los procedimientos principales a realizarse en el marco de la ejecución del Proyecto para la Vigilancia de la diarrea producida por Rotavirus en niños menores de cinco años en Paraguay y pretende ser un material de consulta permanente de las personas involucradas en su desarrollo. Se describen los procedimientos en la captación de los casos, la toma y procesamiento de muestras y de datos relacionados a los casos.

Los objetivos de la propuesta a ser ejecutada en nuestro país son los siguientes:

- Incorporar un método laboratorial rápido para la confirmación de casos de infección por Rotavirus.
- Estimar la incidencia de las hospitalizaciones asociadas a Rotavirus en la población vigilada.
- Caracterizar el comportamiento de las diarreas por Rotavirus en la población bajo vigilancia según grupos etáreos y estacionalidad.
- Estimar la proporción de todas las hospitalizaciones por diarrea atribuibles a Rotavirus.
- Identificar la prevalencia de tipos de Rotavirus en la población bajo vigilancia.

2. Introducción

El conocimiento de la etiología y la epidemiología de la diarrea infantil en un área determinada se hacen necesarios para el establecimiento de medidas de control y/o prevención de la enfermedad diarreica. Aunque la enfermedad diarreica sea una de las enfermedades más comunes en niños pequeños alrededor del mundo, ella asume un significado especial en países en desarrollo donde constituyen la principal causa de mortalidad.

Existe un consenso universal de que los Rotavirus son la causa más importante de la enfermedad diarreica en niños pequeños alrededor del mundo. En países en desarrollo, más de 125 millones de casos de Rotavirus han sido estimados de ocurrir anualmente en niños menores de cinco años de edad; 18 millones de estos casos son moderadamente severos.

Se estima que por año, los Rotavirus sean responsables por 50-70% del total de internaciones por diarrea en todo el mundo y por 500.000 a 800.000 muertes de niños menores de cinco años de edad en los países en desarrollo, lo que representa 6% del total de muertes de niños menores de cinco años en estos países. Esto se traduce en cerca de 2000 a 2400 muertes por día ó 100 muertes por hora en este grupo etáreo. Además de esto existe un consenso general entre los expertos de que Rotavirus no es prevenible a través de mejoras en el saneamiento ambiental y concluyen que la alternativa más viable para prevenir la enfermedad es la introducción de una vacuna en un futuro cercano.

En este sentido, existe la necesidad de determinar la carga de enfermedad por Rotavirus en los países de la Región de las Américas con la finalidad de facilitar la adopción de medidas eficaces para la prevención de la morbi-mortalidad, incluyendo la posibilidad de la vacuna en los programas nacionales de inmunización masiva en la primera infancia.

En Paraguay la diarrea es reconocida como un grave problema de salud pública, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil.

Los datos reportados al Ministerio de Salud, incluyen también datos parciales de los Servicios de Salud dependientes de universidades y del sector privado con algunas limitaciones en relación al registro de la información respecto a cobertura y morbilidad hospitalaria, no contándose con salidas para el análisis de situación.

Ante esta situación similar a la de otros países de la región, y con la ejecución de esta propuesta se pretende implementar un sistema a fin de construir la bases para la realización de otros estudios relativos a carga de enfermedad, estudios de costo y permitir la toma de decisiones informadas sobre prevención.

3. Definiciones Operativas

3.1. Definición de caso

3.1.1. **Caso Sospechoso:** Se considera caso sospechoso de diarrea (3 o más evacuaciones semilíquidas en 24 horas) por Rotavirus a todo niño/a menor de 5 años (60 meses) de edad que es admitido al Hospital Centinela para el tratamiento de la diarrea de menos de 15 días de evolución y que no haya presentado episodio previo de diarrea en los últimos 5 días anteriores al inicio del cuadro actual.

3.1.2. **Caso confirmado:** Un caso confirmado de diarrea por Rotavirus es aquel caso sospechoso en cuya muestra de heces haya sido detectada la presencia de Rotavirus usando un test de ELISA rápido.

3.2. Criterios de Inclusión/Exclusión

3.2.1. Criterios de inclusión:

Se incluye a todo niño/a que es admitido en sala de urgencias/observación o sala de internación por un periodo de tiempo que permite la apertura de una ficha de internación.

3.2.2. Criterios de exclusión:

Se excluyen a:

- * Pacientes de consulta externa y pacientes que desarrollan diarrea posteriormente a su ingreso.
- * Pacientes mayores de 5 años (60 meses) de edad.
- * Pacientes con diarrea crónica

3.3. Definición de Funciones

3.3.1. **Centro Centinela:** Es la Institución integrante de la red de vigilancia participante en este proyecto y que cumple los siguientes criterios:

- Servicio de Pediatría
- Compromiso Institucional.
- Capacidad para el procesamiento y almacenamiento de muestras.
- Capacidad de recolección de datos, análisis y envío de la información semanal.

3.3.2. **Coordinador Centinela:** Responsable por la coordinación del equipo de vigilancia en su centro, el control del llenado completo de las fichas de reporte de casos antes de su envío a la Dirección de Vigilancia de Enfermedades Transmisibles (DIVET) y por el envío de la información semanal y el análisis de la información de su centro.

3.3.3. **Vigilantes:** Responsable por la investigación y detección diaria de los casos sospechosos admitidos en su centro centinela y el control del llenado completo de las fichas de reporte de casos.

3.3.4. **Coordinador del Laboratorio:** Responsable de la vigilancia laboratorial, por el correcto procesamiento de las muestras para detección de Rotavirus, el correcto almacenamiento de alícuotas de las muestras y el llenado completo de la ficha de reporte de caso antes de su envío al Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP).

3.3.5. **Estadígrafo, informático o encargado de procesamiento de datos:** Responsable del llenado de la base de datos.

4. Colecta de muestra y datos:

PARA CADA CASO SOSPECHOSO CAPTADO SE PROCEDERA A LA TOMA DE UNA MUESTRA DE HECES Y LA APERTURA DE UNA FICHA DE REPORTE POR DUPLICADO.

4.1. Apertura y llenado de ficha de reporte.

En la siguiente página se presenta la ficha de reporte que será llenada para cada caso sospechoso en tres tiempos, según las siguientes instrucciones:

• **En urgencias o sala de internación (al momento de la captación):**

- 1º. En el encabezado, llenar el campo correspondiente a nombre completo y número de ficha clínica.
- 2º. Utilizar los datos del nombre completo además de los otros datos requeridos para elaborar el código correspondiente.
- 3º. Llenar además los campos referentes a la información del paciente y la información clínica.

Observación: para el campo AIEPI, referirse al anexo 3 de este manual.

• **En el laboratorio:**

Llenar todos los campos referentes a Información de Laboratorio en muestra fecal y coordinar con el epidemiólogo el llenado completo de las fichas.

• **En epidemiología o por la coordinación centinela:**

Llenar todos los datos referentes al egreso del paciente y asegurar el llenado completo de las fichas.

Los datos completos registrados en cada ficha de reporte, podrán se descargados en una base de datos informática en cada centro centinela. Serán proveídas plantillas electrónicas con el formato de la ficha de reporte en Epi. Info. Versión 6 para su manejo en cada centro (Ver anexo 2. Diccionario para la entrada de datos a la base de datos ROTAPAR).

Nombre Completo: _____

Número de Expediente/Ficha Clínica: _____

**MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y BIENESTAR SOCIAL
LABORATORIO CENTRAL DE SALUD PUBLICA
PROYECTO PARA LA VIGILANCIA DE LA DIARREA PRODUCIDA POR
ROTAVIRUS EN NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS EN PARAGUAY**

FICHA DE REPORTE DE CASOS

responsable:	_____	_____	____/____/____	_____	____/____/____
	[Centro]	[Iniciales]	[Día, Mes y Año de nacimiento]	[Sexo] M/F	[Fecha de ingreso] día, mes, año

Número de expediente/ ficha clínica: _____

Nombre de responsable:

Fecha: (día, mes y año)

Información del paciente

Barrio: _____ Ciudad: _____ Departamento: _____

Información Clínica

Hora de Ingreso: ____: ____ Hospitalizado en: (marque una) urgencia / sala

Peso: ____ kg Talla: ____ cm Temperatura: ____ °C

Vómitos: ____ (Si/No) Episodios de vómito en últimas 24 h: ____ Duración de vómito: ____ días

Diarrea: ____ (Si/No) Episodios de diarrea en últimas 24 h: ____ Duración de diarrea: ____ días

Plan AIEPI: (marque una) A / B / C

Co-morbilidades: (marque una) No / Si - cuales: _____

Responsable:

Fecha:

Egresos

Fecha de resolución de diarrea: ____/____/____ (día, mes y año)

Salida al alta (marque una): Vivo () Fallecido () Desconocido ()

Fecha de alta ó muerte: ____/____/____ Hora de alta ó muerte: ____: ____

Responsable:

Fecha:

Información de Laboratorio en muestra fecal

Muestra colectada: ____ (Si/No) Fecha de toma de muestra: ____/____/____

Frotis de mucus fecal: número de leucocitos/campo: ____ número de hematíes/campo: ____

Bacteria identificada: (marque una) No / No se realizó / Si; Que bacteria?: _____

Parásitos identificados: (marque una) No / No se realizó / Si; Que parásito?: _____

Resultado de Rotavirus: (marque una) Positivo / Negativo / Indeterminado; Método?: _____

Genotipo G: _____ G e n o t i p o

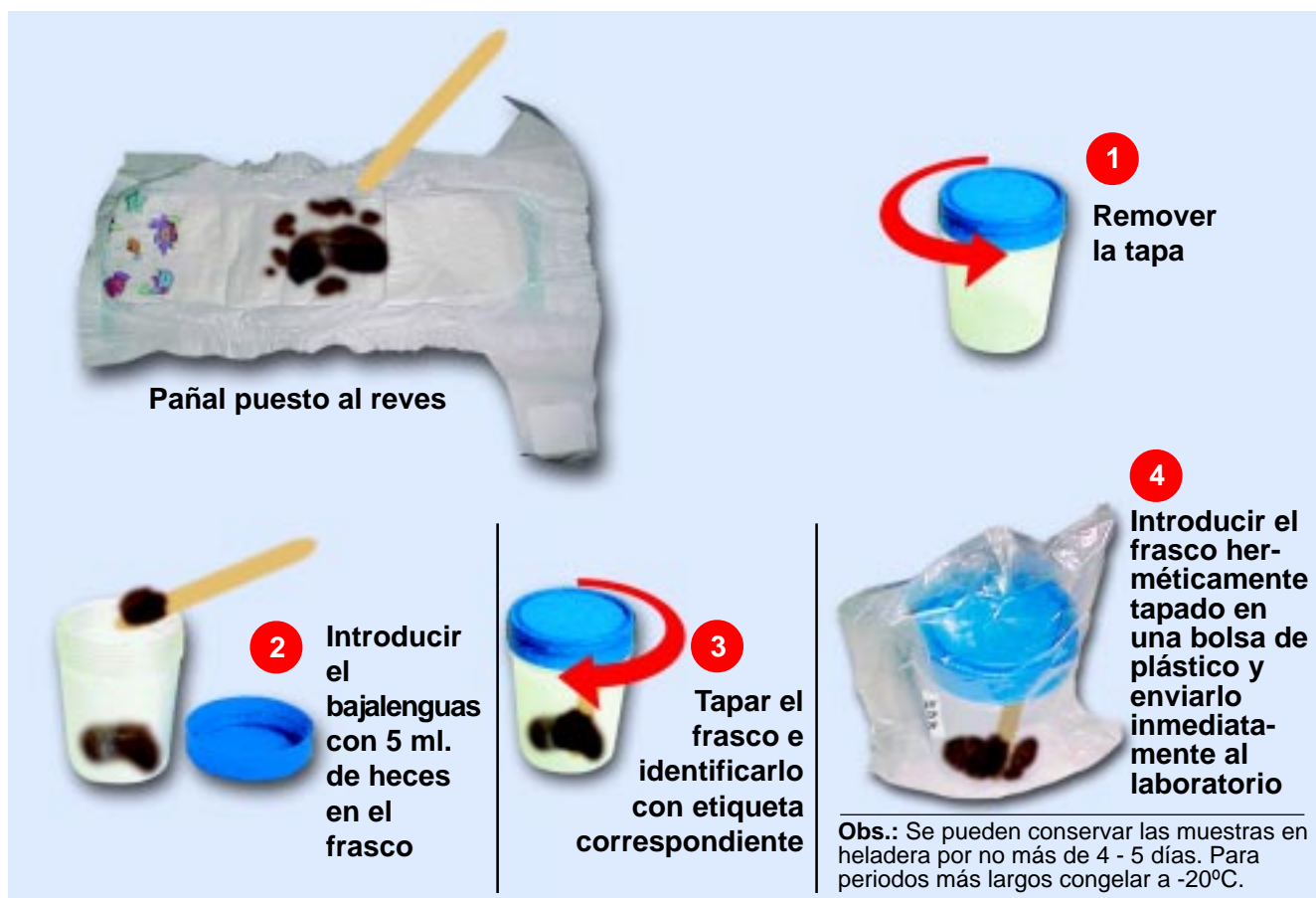
4.2 Toma de muestra

Las muestras serán tomadas como habitualmente y luego enviadas junto con las fichas al laboratorio para su procesamiento.

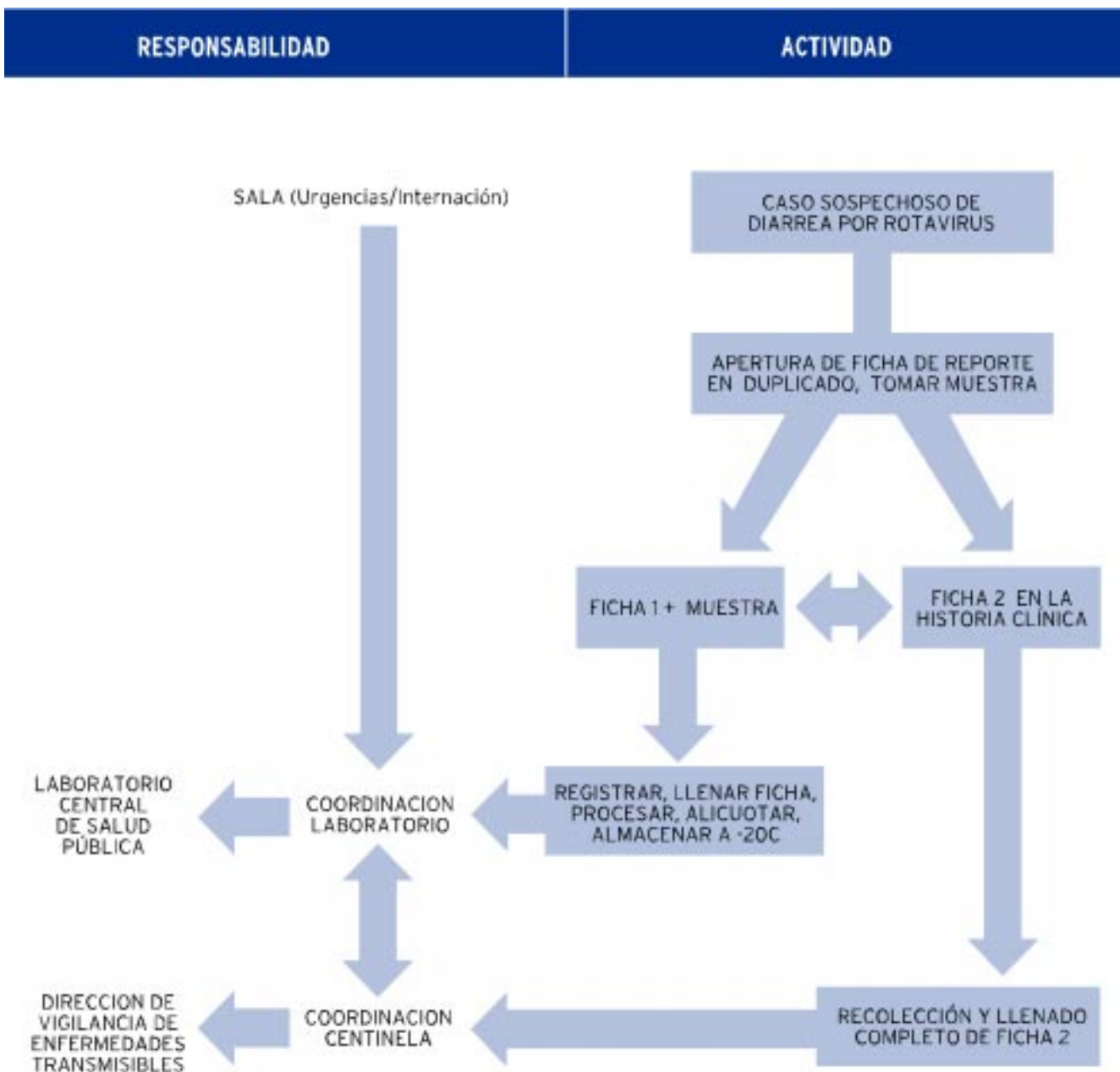
Procedimiento:

- 1 Recoger una cantidad de por lo menos 5 ml de muestra
- 2 Cuando sea posible, se solicitará al paciente que recoja las heces directamente en el frasco estéril sin conservante.
- 3 Cuando no sea posible recoger las heces directamente en el frasco y el paciente sea un niño muy pequeño, esperar a que se produzca la deposición sobre el pañal descartable puesto al revés de modo a evitar la absorción del material.
- 4 Recoger el material desde el pañal con la ayuda de una espátula o bajalenguas descartable y colocarlo en el frasco estéril. (Ver diagrama mas abajo)
- 5 En todos los casos, una vez recogido el material, tapar el frasco e IDENTIFICARLO CORRECTAMENTE.
- 6 Una vez obtenida suficiente cantidad de muestra e identificada correctamente, enviarla al laboratorio junto con la ficha de reporte correspondiente para su procesamiento

NOTA: Si a las 24 hs de la admisión del niño/a no se ha obtenido la muestra, remitir la ficha correspondiente al coordinador del centro centinela quien junto con el laboratorio coordinará la obtención de la misma



5. Flujograma de actividades y responsabilidades - Proyecto para la Vigilancia de las diarreas producidas por Rotavirus en niños menores de cinco años en Paraguay.



6. Procedimientos para registrar, alicuotar y almacenar muestras fecales del proyecto para la Vigilancia de las diarreas producidas por Rotavirus en niños menores de cinco años en Paraguay en los laboratorios centinelas.

CADA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO DEL CENTRO CENTINELA VENDRÁ ACOMPAÑADA DE LA FICHA DE REPORTE.

6.1. Se procederá a registrar la entrada de las muestras en un cuaderno de entradas y resultados que tenga el siguiente formato.

CUADERNO DE ENTRADAS Y RESULTADOS

Numero de entrada	Fecha de entrada	Código	Rotavirus (pos/neg/indeterminado)	Cantidad de alicuotas

6.2. Para cada muestra recibida, identificar 3 (tres) viales con los siguientes datos:

- * Código de muestra (corresponde al de ficha de reporte)
- * Numero de entrada de laboratorio



6.3 Dependiendo de la consistencia de las heces, las alícuotas podrán ser tomadas según una de las siguientes maneras:

* **Para heces de consistencia semisólida o sólida:** con una espátula llenar hasta 3/4 partes del volumen total del vial.



* **Para heces líquidas:** con una pipeta pasteur, llenar hasta 3/4 partes del volumen total del vial.



6.4. Una vez obtenida la alícuota, tapar firme y cuidadosamente el vial con la tapa rosca, cuidando que la misma no haya entrado en contacto con superficies contaminadas y que los guantes y superficies externas de vial no hayan sido contaminados.



6.5. Finalmente, colocar los tres viales (tres alícuotas) correctamente identificados y tapados en la caja porta viales proveída y guardarlos en el freezer -20°C. Las fichas completas deben acompañar a las muestras respectivas al momento de su envío al Laboratorio Central de Salud Pública.



NOTA: LA MUESTRA DEL FRASCO ORIGINAL, SERÁ UTILIZADA PARA SU PROCESAMIENTO EN EL MISMO LABORATORIO CENTINELA POR EL MÉTODO ELISA-DAKO.

7 Procedimientos para la detección de rotavirus en muestras fecales del proyecto para la Vigilancia de las diarreas producidas por Rotavirus en niños menores de cinco años en Paraguay.

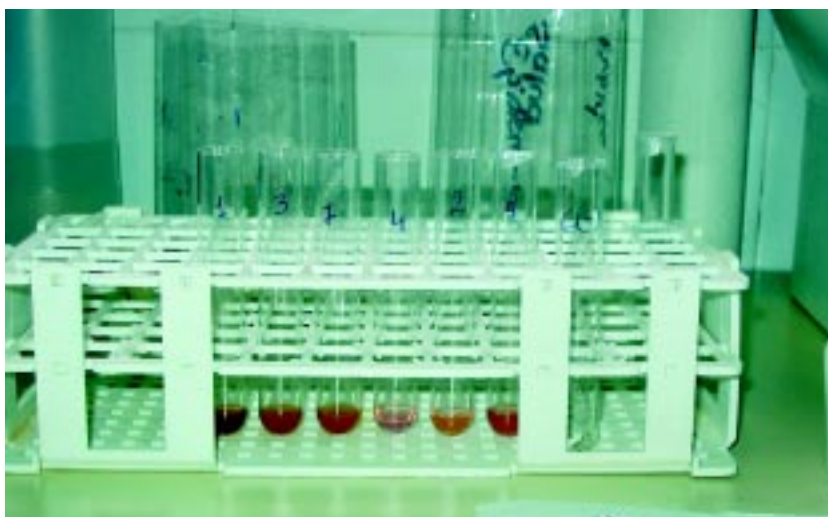
Método: Enzima inmunoensayo (EIA, de la marca Dako Cytomation TM)

Nota: para cada corrida se deben seguir estrictamente las guías proveídas por el fabricante en el inserto que acompaña a cada kit (encuentre una copia en el Anexo 1) Los procedimientos aquí presentados no reemplazan de ninguna manera las guías del fabricante y pretenden, solamente, mostrar de manera grafica los procedimientos generales a seguir en cada paso.

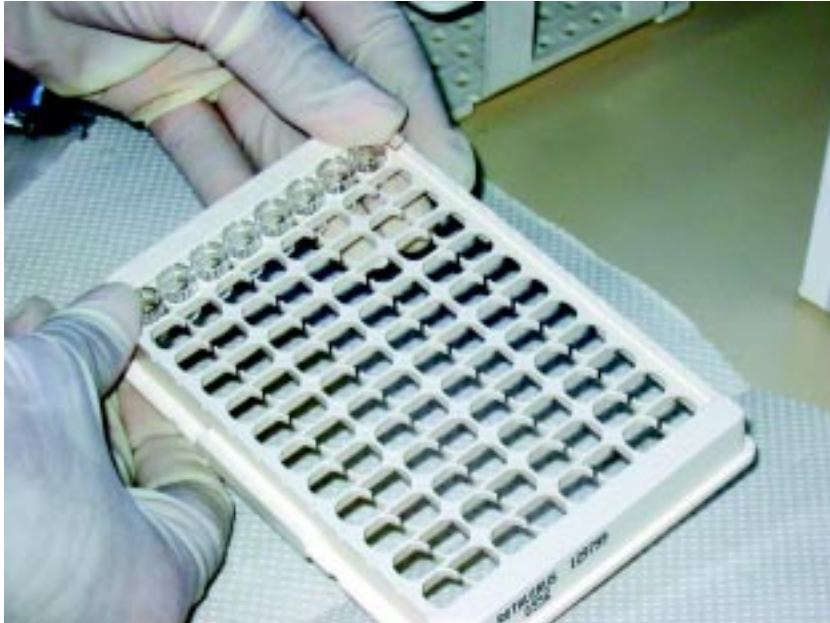
7.1. Antes de iniciar su trabajo, saque los reactivos de la heladera y déjelos atemperar a temperatura ambiente.



7.2. Prepare las suspensiones fecales al 10 %, a partir de los frascos originales siguiendo las instrucciones del inserto y dejando reposar 10 minutos.



7.3. Sacar la cantidad suficiente de pocillos para correr todas las muestras del día, más dos controles (positivo y negativo) y ajustarlos bien al soporte.



7.4. Añadir las suspensiones de muestra y controles a los pocillos correspondientes. Este procedimiento puede realizarse con pipeta automática de 100 ul o con las pipetas de transferencia proveídas por el kit.



7.5. Añadir dos gotas (100 ul) del conjugado desde el mismo frasco gotero a cada uno de los pocillos.



7.6. En este momento, cubrir la placa con un papel de aluminio y dejar incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

7.7. Luego de 1 hora de incubación, descartar el contenido invirtiendo los pocillos sobre un recipiente conteniendo solución desinfectante (ej. hipoclorito 10%). La técnica para descartar el contenido de los pocillos es crítica y debe realizarse con movimiento de una sola vez de manera rápida y firme, asegurando el descarte de todo el líquido posible de los pocillos.



7.8. En este momento se inician los 5 (cinco) ciclos de lavado. Para ello debe prepararse previamente el buffer de lavado según las instrucciones del fabricante (sección 4.2.5 Pág. 44 del inserto del kit).



7.9. Añadir aproximadamente 350 ul del buffer de lavado a cada pocillo, asegurando el llenado completo de todos los pocillos.



7.10. Luego proceder a descartar el contenido de los pocillos de la misma manera descrita en 7.7



7.11. Para asegurar el vaciado completo, golpear los pocillos invertidos sobre un papel absorbente limpio. Repetir los pasos 7.9, 7.10, y 7.11 cinco veces.

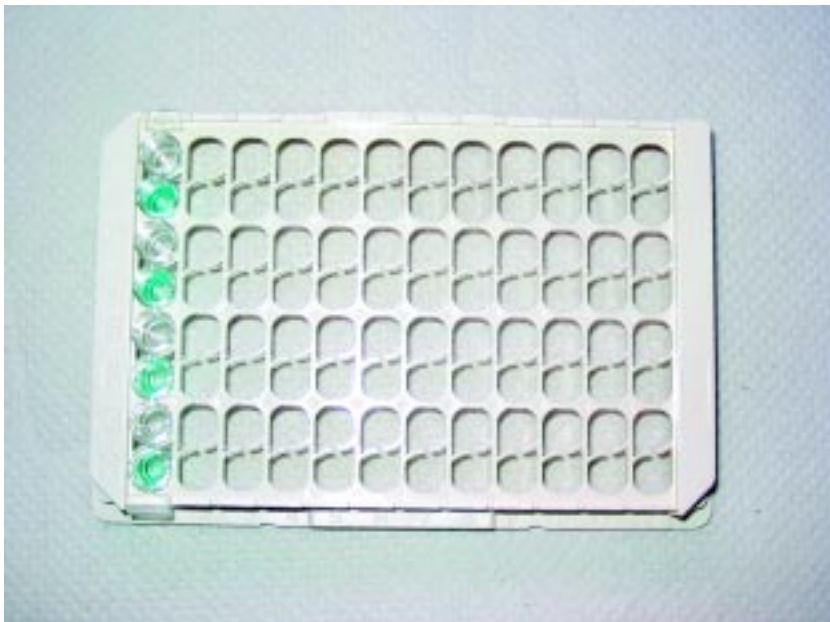


7.12. Añadir dos gotas (100 ul) de sustrato a cada uno de los pocillos desde el mismo frasco gotero.



7.13. Dejar incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos,

7.14. Pasados los 10 minutos, observar el desarrollo del color y proceder a la lectura visual de los resultados



7.15. Pasados los 10 minutos parar la reacción añadiendo 2 gotas (100 ul) de solución de parada



7.16. Los pocillos adquieren un color amarillo que puede leerse visualmente o fotométricamente.



NOTA: LAS MUESTRAS CON RESULTADOS INDETERMINADOS, SERÁN REPROCESADAS EN EL LABORATORIO CENTRAL DE SALUD PÚBLICA CON PROCEDIMIENTOS ADICIONALES NO DESCRITOS EN ESTE MANUAL.

8. Registro y Emisión de Resultados de laboratorio

Los resultados de cada corrida de ELISA se registrarán en el laboratorio en una hoja de trabajo con el siguiente formato:

Proyecto para la vigilancia de la Diarrea producida por
Rotavirus en niños menores de cinco años en Paraguay

Centro Centinela: _____

Fecha de Corrida: ___/___/___

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											

Numero de muestras: _____

Numero de controles: _____

Numero de repeticiones: _____

Total de determinaciones realizadas: _____

Biquímico Responsable

Nombre y apellido: _____

NOTA: CADA CASILLA CORRESPONDE A LA POSICIÓN DE CADA UNO DE LOS POCILLOS EN LA PLACA DE 96. REGISTRAR LA UBICACIÓN DE CADA MUESTRA Y SU RESULTADO CORRESPONDIENTE EN LA HOJA DE TRABAJO.

Los resultados así obtenidos se registrarán en el cuaderno de entradas y resultados del laboratorio y en la ficha de reportes en el apartado correspondiente a Información de laboratorio.

9. Procedimientos para el Control de Calidad del sistema diagnóstico de Rotavirus por la técnica de ELISA.

Se implementará un sistema de control de calidad de los procedimientos de laboratorio, a través de dos métodos.

1. Envío de un panel de no más de cinco muestras desconocidas preparadas en el Laboratorio Central de Salud Pública a cada uno de los laboratorios centinelas.
2. El reprocesamiento del 10% de las muestras colectadas por centro centinela por mes seleccionadas al azar e independientemente de los resultados obtenidos.

Se plantea el inicio del primer abordaje en el primer trimestre y del segundo abordaje desde el inicio de las actividades.

Los resultados obtenidos a través de este sistema serán registrados, analizados y discutidos con los laboratorios participantes, resguardando la confidencialidad y con el propósito de plantear las medidas correctivas oportunamente.

10. Indicadores de Evaluación (Resumen quincenal)

Siguiendo el esquema de abajo, quincenalmente serán enviados resúmenes de los resultados generales obtenidos en cada hospital centinela, con fines de evaluación de los indicadores del sistema.

REPORTE QUINCENAL DE PROYECTO ROTAVIRUS

Centro: _____

Responsable: _____

Semana Epidemiológica N°: _____

De ____ / ____ / ____ a ____ / ____ / ____

Numero total de ingresos en < 5 años: _____

Numero de ingresos por diarrea en < 5 años: _____

Numero de casos sospechosos: _____

Numero de fichas con muestra: _____

Numero de casos confirmados: _____

Porcentaje de detección en la semana: _____

Porcentaje de cumplimiento de la semana anterior: _____

Barrios causando alertas:(barrios con múltiples casos confirmados) _____

ANEXO 1

TECHNICAL ADVICE AND CUSTOMER SERVICE
 CONSEIL TECHNIQUE ET SERVICE CLIENTELE
 TECHNISCHE BERATUNG UND KUNDENDIENST
 SOPORTE TECNICO Y SERVICIO AL CLIENTE

For all enquiries please contact your local DAKO subsidiary of distributor.

Pour toute information, veuillez contacter votre filiale ou votre distributeur local(e) DAKO.

Anfragen jeder Art richten Sie bitte an die für Sie zuständige DAKO- Niederlassung oder an Ihren Händler.

Para cualquier información contacten por favor con la delegación o el distribuidor local de DAKO.

Manufactured by/ Fabriqué par/
 Hersteller/ Fabricado por:

DAKO Ltd.,
 Denmark House,
 Angel Drove, Ely,
 Cambridgeshire, CB7 4ET
 United Kingdom

Telephone: +44 1353 669911
 Fax: +44 1353 668989

IDEIA™ Rotavirus
 November 2000
 98 07 028

IDEIA™ Rotavirus

An enzyme immunoassay for the detection of Rotavirus in human faecal specimens

For in vitro diagnostic use

Test immunoenzymatique pour la détection des Rotavirus dans les fèces humaines

Pour utilisation in vitro

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Rotavirus in humanen Fäkalproben

in vitro diagnostikum

Enzimoinmunoensayo para la detección de Rotavirus en muestras fecales humanas

Para diagnóstico in vitro

96 Determinations
Bestimmungen
Determinaciones

Code No.
K6020.1

1 APLICACION

El ensayo IDEIA™ Rotavirus es un enzimoimmunoensayo cualitativo para la detección de Rotavirus (Grupo A) en muestras fecales humanas, el cual puede ser leído visualmente fotométricamente como ayuda en el diagnóstico de gastroenteritis aguda causada por Rotavirus del Grupo A.

2 RESUMEN

Los Rotavirus son virus de ARN sin envoltura que constan de un núcleo interno esférico y dos cáscaras exteriores capsidiales.¹ Se han identificado por lo menos seis serogrupos (A-F) dentro del género Rotavirus.^{1,2}

Los serotipos humanos de Rotavirus Grupo A son el causante principal de gastroenteritis en niños pequeños por todo el mundo.^{3,4,5,6,7} Gastroenteritis debidas a Rotavirus también se encuentran en niños mayores y en grupos de gente de edad.^{8,9,10} El virus se asocia muy a menudo con infecciones nosocomiales en salas pediátricas y de niños recién nacidos. Las epidemias pueden tener como resultado la hospitalización y el tratamiento prolongado de niños infectados.^{11,12,13} Las gastroenteritis debidas a Rotavirus pueden ser graves, pudiendo causar hasta la muerte, en niños malnutridos o inmunocomprometidos.^{8,9,10}

El diagnóstico en el laboratorio de infecciones de Rotavirus desempeña un papel importante en el tratamiento de pacientes y permite la administración y control efectivos de las epidemias. Actualmente los serotipos humanos de Rotavirus no se cultivan fácilmente en sistemas de cultivo celular, así que es difícil aislarlos de muestras clínicas.¹⁴ Por lo tanto, el diagnóstico en el laboratorio de infecciones de Rotavirus depende de la detección directa del virus o de antígenos virales en muestras fecales. Se puede hacer esto mediante microscopía electrónica o radioimmunoensayo para detectar el virus o los antígenos virales, o con electroforesis de geles de poliacrilamida para detectar ARN del genoma del Rotavirus.^{3,15,16,17} Estos procedimientos exigen mucho en términos técnicos y necesitan equipos especializados y por eso su aplicación es limitada.¹⁴

Recientemente se han descrito enzimoimmunoensayos, usando anticuerpos monoclonales o policlonales para la detección directa de Rotavirus en muestras clínicas.^{18,19,20,21} Estos ensayos ofrecen un método rápido, sensible y específico para detectar los Rotavirus en muestras fecales.

El ensayo IDEIA™ Rotavirus es un inmunoensayo para la detección de Rotavirus de Grupo A en muestras fecales. El ensayo utiliza un anticuerpo policlonal para detectar proteínas específicas del grupo, incluso la principal proteína capsidial interior (VP6), que existe en los Rotavirus del Grupo A.

3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo IDEIA™ Rotavirus utiliza un anticuerpo policlonal en un enzimoimmunoensayo «sandwich» de fase sólida para detectar el antígeno específico del grupo que se encuentra en los Rotavirus del Grupo A.

Se revisten micropocillos separables del anticuerpo policlonal específico para el Rotavirus. Se añade una suspensión fecal o una muestra control al micropocillo y se incuba simultáneamente con un anticuerpo policlonal específico para el Rotavirus conjugado con peroxidasa de rábano. El antígeno del Rotavirus que existe en la muestra es capturado entre el anticuerpo en la fase sólida y el anticuerpo conjugado con el enzima. Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, se lavan los micropocillos en tampón de lavado diluido para eliminar el exceso de la muestra y cualquier anticuerpo libre que no esté conjugado con enzima. Se añade un cromógeno a los pocillos y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. La presencia en los pocillos de anticuerpo conjugado con el enzima unido específicamente, se manifiesta en un cambio de color que se bloquea mediante la adición de la solución de parada de carácter ácido. Cualquier coloración significativamente intensa por encima de los valores de fondo es indicativa de la presencia de Rotavirus en la muestra o en el control.

4 REACTIVOS SUMINISTRADOS

Cada kit contiene material suficiente para 96 determinaciones. Se indica la fecha de caducidad del kit en la etiqueta exterior de la caja.

4.1 CONTENIDO DEL KIT DE IDEIA™ ROTAVIRUS

Un folleto de información sobre el producto. 96 micropocillos recubiertos con un anticuerpo policlonal de conejo específico de Rotavirus. Se presentan los 96 pocillos en una placa de microtitulación con 12 tiras de plástico, cada una de las cuales contiene 8 pocillos separables. Se suministra además una bolsa de plástico sellable para la conservación subsiguiente de pocillos y tiras no usados.

Se suministra un frasco de cada uno de los siguientes reactivos:

- Reactivo Nº 1** 110mL de diluyente de muestras: solución salina tris tamponada que contiene un agente anti-microbiano y colorante rojo.
- Reactivo Nº 2** 5mL de control positivo: Rotavirus bovino inactivado (cepa de Rotavirus de ternera 3209176) en tampón conteniendo agente antimicrobiano y colorante rojo. Antes de la inactivación, se observa que el material del control positivo contiene aproximadamente 10 5 unidades infecciosas por mL, al ser determinado por cultivo celular.
- Reactivo Nº 3** 13mL de conjugado: anticuerpo policlonal de conejo específico para Rotavirus conjugado con peroxidasa de rábano en una solución tamponada de proteína que contiene un agente anti-microbiano y un colorante azul.
- Reactivo Nº 4** 50mL de solución madre de tampón de lavado (25x): solución tris tamponada que contiene un agente anti-microbiano y detergente.
- Reactivo Nº 5** 13mL de sustrato: Estabilizar el peróxido y el 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine en una solución tampón diluida. Se ha descrito que el TMB no es carcinógeno. Sin embargo se recomienda un equipo de protección personal para evitar la exposición directa al mismo.
- Reactivo Nº 6** 12mL de solución de parado: 0,46 mol/L ácido sulfúrico.

4.2 PREPARACION, CONSERVACION Y NUEVO EMPLEO DE COMPONENTES DEL KIT

El formato del kit IDEIA™ Rotavirus permite probar hasta treinta y dos lotes de muestras y controles. Para asegurar la prestación óptima del kit es importante conservar los componentes no usados del kit según las instrucciones a continuación descritas:

4.2.1 Micropocillos revestidos de anticuerpos

Abrir la bolsa cortando a lo largo del sello. Separar la cantidad deseada de pocillos y colocarlos en el portapocillos. Volver a colocar los pocillos y las tiras no usadas en la bolsa sellable junto con el desecante. Volver a sellar la bolsa con cuidado y conservarla a 2-8 °C. Se pueden utilizar las tiras hasta 16 semanas después de la primera apertura, siempre que hayan sido conservadas de esta manera.

4.2.2 Diluyente de muestras (Reactivo N ° 1)

Suministrado listo para usar. Conservar el diluyente de muestras no usado a 2-8 °C. Cuando la muestra se almacena a 2-8 °C puede formarse una ligera precipitación. Esta se redisolverá, previamente a su uso, dejando atemperar los reactivos (15-30 °C) tal como se indica en la Sección 8 del Manual de Uso.

NOTA: Se requiere diluyente de muestras para servir de control negativo y se debe guardar una cantidad suficiente para usar con cada lote de muestras probadas. Al usarlo como control negativo, se debe colocar una alícuota en un frasco idéntico a los usados para la preparación de diluciones de muestras, para asegurar que los frascos no contengan sustancias que causen interferencia.

4.2.3 Control positivo (Reactivo N ° 2)

Suministrado listo para usar. Conservar el control positivo no usado a 2-8 °C.

4.2.4 Conjugado (Reactivo N ° 3)

Suministrado listo para usar. Conservar el conjugado no usado a 2-8 °C.

4.2.5 Tampón de lavado (Reactivo N ° 4)

Suministrado en solución madre de 25x. Diluir la solución madre de tampón de lavado añadiendo 1 parte de la solución madre a 24 partes de agua destilada. Hay suficiente solución madre para suministrar 100mL de tampón de lavado diluido para 5 lavados de cada tira de 8 pocillos. Preparar tampón de lavado diluido según los requerimientos en el día de su uso. Conservar la solución madre sobrante a 2-8 °C.

Se recomienda firmemente que no se guarde el tampón de lavado diluido ni que se almacene para uso posterior. (Ver sección 5.2.9)

4.2.6 Sustrato (Reactivo N ° 5)

Suministrado listo para usar. Conservar el sustrato no usado a 2-8 °C.

4.2.7 Solución de Parado (Reactivo N ° 6)

Suministrada lista para usar. Conservar la solución para parar la reacción no usada a 2-8 °C.

5 PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico in vitro. Cualquier persona que utilice o realice ensayos con este producto debe ser formada previamente para su uso y debe tener experiencia en técnicas de laboratorio.

5.1 PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

5.1.1 El control positivo contiene Rotavirus bovino inactivado, que ha resultado ser no infeccioso en cultivo celular. Sin embargo, se debe manejar y desechar el control como si fuera potencialmente infeccioso.

5.1.2 La solución de parado contiene ácido sulfúrico (0,46 mol/L). Evite contacto con la piel o membranas mucosas. Si la solución de parado se pone en contacto con dichas partes del cuerpo, lavarlas de inmediato con agua.

5.1.3 No comer, beber, fumar, almacenar o preparar alimentos, o aplicar cosméticos dentro de la zona designada de trabajo.

5.1.4 No pipetear materiales con la boca.

5.1.5 Llevar guantes desechables al manejar muestras clínicas y reactivos. Deberá evitarse la contaminación de los micropocillos con talco o almidón puesto que se ha demostrado que estas partículas pueden catalizar una autooxidación de la solución sustrato. Siempre lavarse las manos después de trabajar con material potencialmente infeccioso.

5.1.6 Las muestras, controles positivos y todos los materiales que se ponen en contacto con ellos deben manejarse y desecharse como si fueran potencialmente infecciosos.

5.1.7 Desechar todas las muestras clínicas y material infectado o potencialmente infectado según la legislación local.

5.1.8 Los reactivos de IDEIA™ Rotavirus contienen un agente antimicrobiano adecuado, el cual no presenta ningún tipo de riesgo para el usuario, siempre que se respeten las precauciones de seguridad usuales de laboratorio.

5.2 PRECAUCIONES TECNICAS

- 5.2.1 No hay que usar componentes después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- 5.2.2 Se suministran los reactivos en concentraciones de trabajo fijas. La realización de la prueba puede resultar afectada si se modifican los reactivos o si no se conservan bajo las condiciones recomendadas en Sección 4.2.
- 5.2.3 No se debe mezclar o intercambiar distintos lotes de reactivos.
- 5.2.4 Se debe evitar la contaminación microbiana de los reactivos, y no usar aquellos que manifiesten indicios de contaminación o precipitación.
- 5.2.5 Usar pipetas o puntas de pipeta desechables nuevas para cada muestra, control o reactivo, para evitar contaminación cruzada de las muestras o de los controles, la cual podría causar resultados erróneos.
- 5.2.6 Evitar la contaminación con iones metálicos y agentes oxidantes.
- 5.2.7 No se debe usar sustrato que manifieste un color azul antes de ser añadido a los pocillos.
- 5.2.8 NO SE DEBE volver a usar los micropocillos.
- 5.2.9 No se debe conservar tampón de lavado diluido no usado para uso posterior. Cuando no estén en uso los depósitos de tampón de lavado deben ser lavados en agua destilada y dejados a secar.
- 5.2.10 El equipo lavador, al igual que el equipo automatizado, tiene que estar libre de contaminación microbiana y debidamente calibrado y mantenido según las instrucciones del fabricante.

6 REACTIVOS Y EQUIPOS ADICIONALES REQUERIDOS

6.1 REACTIVOS

Agua desionizada o destilada.

6.2 ACCESORIOS Y EQUIPOS

Recipientes adecuados para recoger muestras fecales.

Recipientes desechables limpios con tapones de rosca (capacidad mínima de 3mL) para la preparación de suspensión fecal.

Papel absorbente limpio (en el cual se puede golpear ligeramente los micropocillos para secarlos).
Micropipetas de precisión y puntas desechables para dispensar volúmenes de 50µL, 100µL y 1000µL (opcionales).

Cien pipetas desechables de plástico, disponibles en la sucursal DAKO de su país o en su distribuidor local. Código de Producto nº S6016.

Recipiente para tirar desechos con desinfectante tipo aldehídico o clorhídrico.

Frasco limpio de plástico para lavar, o equipo o dispositivo adecuado para lavar los micropocillos.

Espectrofotómetro o lector de placas EIA capaz de leer a una absorción de 450nm (opcional).

7 RECOGIDA Y PREPARACION DE MUESTRAS

7.1 RECOGIDA DE MUESTRAS

Se deben recoger las muestras fecales tan pronto como sea posible después del comienzo de los

síntomas. La máxima expulsión de Rotavirus en las heces de pacientes con gastroenteritis suele ocurrir a los 3-5 días después del comienzo de los síntomas.⁵

Se deben recoger las muestras fecales para análisis directo en recipientes que no contengan medios, conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes ni detergentes, porque todos estos aditivos puedan perjudicar el ensayo IDEIA™ Rotavirus. Si se recogen mediante torundas rectales deben contener suficiente material fecal para obtener una suspensión del 10% de heces. (véase Sección 7.2)

Las muestras pueden conservarse a 2-8 °C durante 7 días antes del ensayo. Para la conservación a largo plazo de muestras fecales, se deben conservar a -20 °C.

7.2 PREPARACION DE MUESTRAS FECALES

Añadir 1mL de diluyente de muestras (Reactivo N ° 1) en un recipiente correctamente etiquetado y usarlo para preparar una suspensión o dilución de 10% de muestra fecal añadiendo aproximadamente 0.1g de heces sólidas (pieza del tamaño de un guisante pequeño) o aproximadamente 100µL de heces líquidas. Mezclar bien y dejar reposar durante 10 minutos antes de efectuar el ensayo.

Hacer girar las torundas rectales en 1mL de diluyente de muestras, apretando a la vez el tapón contra el lado del recipiente para soltar el material fecal. Mezclar bien y dejar reposar durante 10 minutos antes de efectuar el ensayo.

Se pueden conservar muestras suspendidas/diluidas en diluyente de muestras de IDEIA™ Rotavirus a 2-8 °C hasta 8 días antes de efectuar el ensayo.

NOTA: Las muestras fecales preparadas en diluyente de muestras de Adenovirus IDEIA™ también pueden probarse en el ensayo IDEIA™ Rotavirus. Las suspensiones fecales preparadas en agua destilada o desionizada o en solución salina tamponada con fosfato no son aptas para probarse en el ensayo IDEIA™ Rotavirus.

8 PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS

SIRVASE REFERIRSE A SECCION 5.2, PRECAUCIONES TÉCNICAS, ANTES DE PROCEDER A EFECTUAR EL ENSAYO

Los reactivos y muestras deben calentarse a temperatura ambiente (15-30 °C) antes de su uso. Se pueden añadir los reactivos a los micropocillos mediante el uso del frasco cuentagotas de reactivo o de una pipeta de precisión (después de quitar el tapón de rosca y la boquilla del cuentagotas).

Usar el mismo método para añadir muestras y reactivos (gotas o pipetas de precisión) durante todo el procedimiento del ensayo.

8.1 PREPARACION DE CONTROLES

Control Negativo (Reactivo Nº 1)

Añadir 1mL de diluyente de muestras a un frasco idéntico a los usados para la dilución de muestra.

Control Positivo (Reactivo Nº 2)

El control positivo está listo para usar. Mezclar suavemente antes de uso.

Hay que incluir por lo menos un control positivo y un negativo de IDEIA™ Rotavirus en cada lote de muestras que se realiza (véase Sección 8.2.1)

8.2 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Cuando se usan botellas cuentagotas de reactivo, mantener las botellas en una posición vertical con la boquilla aproximadamente 5mm encima del micropocillo. Presionar la botella suavemente y asegurar que las gotas caigan libremente en los micropocillos sin tocar los lados. Evitar contaminación de las

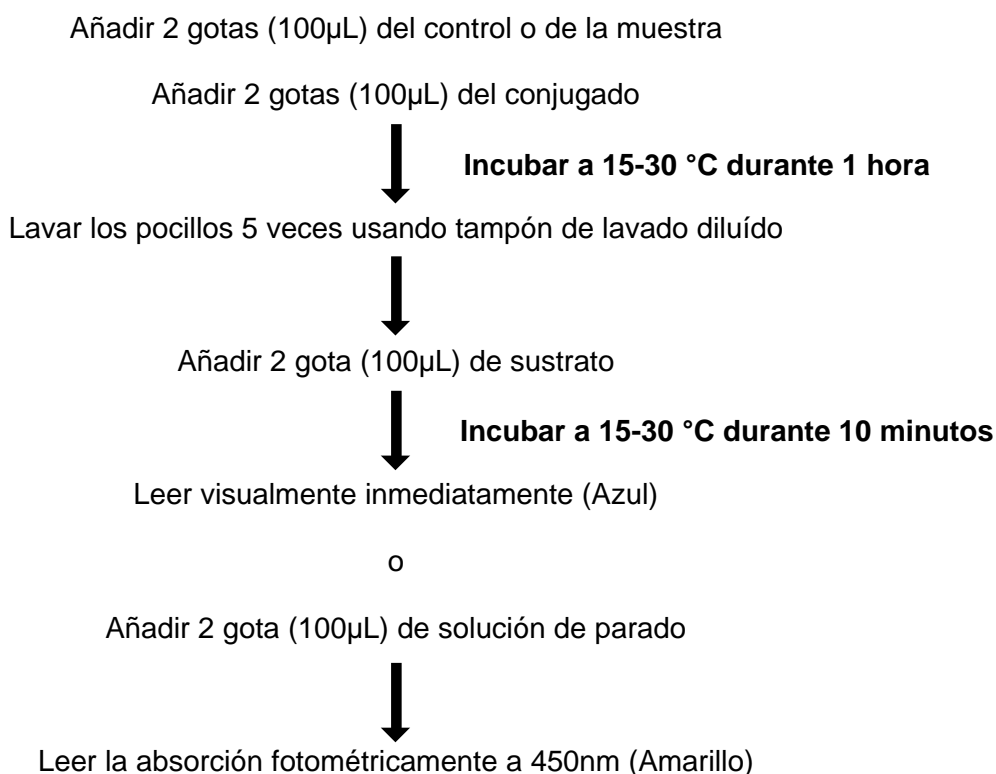
boquillas de las botellas.

8.2.1 Adición de la Muestra

Sacar y separar suficientes pocillos para muestras y controles e introducirlos firmemente en el portatiras de plástico. Añadir 2 gotas (100µL) de cada muestra fecal diluída, control negativo (Reactivo 1), o control positivo (Reactivo 2) a los micropocillos individuales. Se debe incluir por lo menos un control positivo y un control negativo en cada lote de pruebas.

No se debe agitar ni tomar una muestra del sedimento en el frasco de muestra. Al dispensar muestras, mantener la pipeta en una posición vertical con la punta encima del micropocillo y asegurar que se dispense la muestra sin tocar los lados del micropocillo. Evitar una contaminación cruzada entre los pocillos de muestra y de control porque esto puede causar resultados erróneos.

Resumen del Procedimiento del Ensayo de IDEIA™ Rotavirus



8.2.2 Adición del Conjugado

Después de añadir muestras y controles a los pocillos, añadir 2 gotas (100µL) de conjugado (Reactivo 3) a cada micropocillo y mezclar suavemente.

8.2.3 Primera incubación

Incubar micropocillos a la temperatura ambiente (15-30 °C) durante 60 ± 5 minutos.

8.2.4 Lavado de los pocillos

Se debe aspirar o desechar el contenido de los pocillos, sacando tanto líquido como sea posible, en un recipiente que contenga desinfectante (véase Sección 6.2). Entonces se debe lavar los pocillos usando

tampón de lavado diluido recién preparado (véase Sección 4.2.5). La técnica de lavado es crítica para la realización del ensayo y debe realizarse de tal modo que se asegure el llenado y vaciado completo de los pocillos (con una cantidad mínima de 350µL tampón de lavado diluido). Un mínimo de 5 ciclos de lavado es imprescindible. Después del lavado final, aspirar o desechar a sacudidas el tampón de lavado y asegurar que los pocillos invertidos estén completamente vacíos golpeándolos ligeramente en papel absorbente limpio. Se pueden realizar los 5 ciclos de lavado usando técnicas manuales (p.ej. una botella flexible o una pipeta de 8 canales) o mediante el uso de un lavador automático de microplacas, siempre que se satisfagan todos los criterios mencionados.

8.2.5 Adición e incubación del sustrato

Añadir 2 gota (100µL) de sustrato (Reactivo 5) en cada micropocillo.

8.2.6 Segunda incubación

Incubar a temperatura ambiente (15-30 °C) durante 10 minutos.

Se pueden leer los pocillos visualmente inmediatamente después de la segunda incubación (véase Sección 8.3.2)..8

8.2.7 Bloqueo de la reacción

Bloquear la reacción del sustrato añadiendo 2 gota (100µL) de solución de parado (Reactivo 6) a cada pocillo. Asegurar el mezclado completo en los pocillos antes de leer los resultados. El producto coloreado queda estable durante 30 minutos después de añadir la solución de parado.

8.3 LECTURA DE LOS RESULTADOS

8.3.1 Lectura fotométrica

Se deben leer los pocillos fotométricamente dentro de 30 minutos después de añadir la solución de parado. Mezclar el contenido de los micropocillos y leer la absorción de cada pocillo usando un espectrofotómetro adecuado o un lector de placas EIA ajustado a 450nm. Asegurar que los fondos de los pocillos estén limpios antes de realizar la lectura y verificar que no hay material ajeno presente en los pocillos. El lector debe ser puesto a cero al aire (a saber sin placa en el soporte) antes de efectuar la lectura de la placa.

Alternativamente, si el espectrofotómetro permite el uso de una longitud de onda de referencia (de 620 - 650nm), se debe realizar una lectura de doble longitud de onda porque esto elimina posible interferencia debido a aberraciones, tales como suciedad o manchas en la superficie óptica de los pocillos.

8.3.2 Lectura visual

Se pueden evaluar los pocillos visualmente inmediatamente después de la segunda incubación. Se recomienda para los pocillos en los cuales es difícil interpretar la intensidad del color al compararse con el control negativo, que se lean fotométricamente también después de la adición de solución de parado. (véase Sección 9.3).

9 CONTROL DE CALIDAD E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

9.1 CONTROL NEGATIVO

Tal como se indica en Sección 8.1 se debe incluir por lo menos un control negativo en cada lote de ensayos.

Determinación fotométrica

El valor del control negativo, o el valor medio de los controles negativos debe ser inferior a 0.150 unidades de absorción.

Cálculo del valor de cut-off

Se calcula el valor de cut-off añadiendo 0.100 unidades de absorbancia al valor de control negativo o al valor medio cuando se incluye más de un control negativo.

Determinación visual

El pocillo de control negativo no debe tener ningún color visible. Si esto no es así, el ensayo debe ser leído fotométricamente o repetido.

9.2 CONTROL POSITIVO

Tal como se detalla en la Sección 8.1 deberá incluirse un control positivo como mínimo en cada ensayo.

Determinación fotométrica

El control positivo debe tener un valor superior a 0.500 unidades de absorbancia.

Determinación visual

El micropocillo de control positivo debe tener un color inconfundiblemente azul que es claramente distinguible del control negativo.

9.3 MUESTRAS**Determinación Fotométrica**

Cualquier muestra que tenga un valor de absorbancia superior al cut-off es positiva (vease Sección 9.1). Cualquier muestra que tenga un valor de absorbancia inferior al cut-off debe considerarse negativa. Un resultado con una variación de 0.010 unidades de absorbancia del valor del cut-off debería ser considerado como erróneo. Estos resultados deberían ser interpretados conjuntamente con la información clínica-epidemiológica del paciente. Alternativamente se debería retestar la muestra o repetir el muestreo del paciente.

Determinación visual

Se debe considerar positiva, cualquier muestra que tenga un color azul de mayor, siempre que el control negativo sea incoloro. Cualquier muestra que carezca de color visible debe ser considerada negativa.

Si el control negativo muestra algo de color azul visible, los resultados deberán ser leídos fotométricamente después de la adición de la solución de parada o bien el test deberá ser repetido.

Si, después de añadir el sustrato, el contenido de un micropocillo toma un color azul oscuro y forma un precipitado azul-negro, se debe considerar la muestra positiva.

10 LIMITACIONES DE LA TÉCNICA

10.1 Un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección de Rotavirus en el paciente. El hecho de que no se detecte Rotavirus puede resultar de factores tales como la recogida de una muestra tomada en un momento inoportuno de la enfermedad en el cual insuficientes viriones están presentes, o muestreo o manejo incorrectos de la muestra.

10.2 El ensayo IDEIA™ Rotavirus detecta proteínas virales específicas para el grupo que está presente en serotipos humanos de Rotavirus de Grupo A. No se puede usar el ensayo para diferenciar entre serotipos de Rotavirus de Grupo A, ni para detectar otros serogrupos de Rotavirus (B-F).

10.3 Se suministran todos los reactivos a unas concentraciones determinadas. Se puede perjudicar los resultados de la prueba si se modifican o conservan los reactivos incorrectamente.

10.4 Un resultado positivo no excluye la presencia de otros patógenos entéricos. Aunque la conexión entre Rotavirus y gastroenteritis está bien establecida, la infección concurrente con otros patógenos microbianos es posible. Se deben realizar pruebas microbiológicas adicionales paralelas al ensayo IDEIA™ Rotavirus para excluir otras posibles causas de la enfermedad.

10.5 El ensayo de muestras de meconio no ha sido validado por lo que no se recomienda el test de IDEIA™ Rotavirus para dichas muestras.

10.6 Los resultados del test deben de ser interpretados conjuntamente con estudios epidemiológicos, ensayos clínicos del paciente y otros procedimientos diagnósticos.

11 VALORES ESPERADOS

Los niveles de positividad pueden variar según la prevalencia de los Rotavirus en poblaciones distintas, situaciones geográficas, métodos de recogida de muestras, manejo, conservación y transporte de muestras y el nivel de salud en general del grupo de pacientes bajo investigación.11,12,13,21.10

El Rotavirus es la causa más común de gastroenteritis en niños entre las edades de 6 meses y 3 años y es responsable del 30-50% de enfermedades diarreicas en infantes y niños pequeños hospitalizados. Rotavirus también está asociado con epidemias de diarrea en grupos geriátricos o en instituciones.20

12 CARACTERISTICAS ESPECIFICAS DE LOS RESULTADOS

12.1 ESTUDIOS CLINICOS

El ensayo IDEIA™ Rotavirus fue probado en estudios clínicos efectuados en tres centros en Gran Bretaña. Se realizaron estudios en muestras fecales tomadas de pacientes con síntomas de gastroenteritis. Se compararon los resultados del ensayo IDEIA™ Rotavirus con Microscopía Electrónica (ME) y con un enzimoimmunoensayo comercial (EIA) para la detección directa de Rotavirus en muestras fecales.

Un total de 201 muestras fecales fueron probadas. Se muestran los resultados de estos estudios en Tabla 1.

12.2 RESULTADOS CLINICOS

El ensayo IDEIA™ Rotavirus, cuando se leyó fotométricamente, mostró una correlación del 99.5% (200/201) con Microscopía Electrónica (ME) y del 99.0% (199/201) con un EIA comercial. La sensibilidad y especificidad totales del ensayo IDEIA™ Rotavirus, al compararse con la ME, fueron del 100% (77/77) y el 99.2% (123/124) respectivamente. La sensibilidad y especificidad relativas comparadas con los kits EIA comercializados fueron de 89.7% (77/78) y 99.2% (122/123) respectivamente (ver Tabla 1). Las mismas muestras fueron también interpretadas visualmente y los datos se presentan en la Tabla 2.

TABLA 1

Comparación de IDEIA™ Rotavirus (determinación fotométrica) con Microscopía Electrónica y EIA.

METODO	ME		EIA		
	+	-	+	-	
IDEIA™ Rotavirus	+	77	1	77	1
	-	0	123	1	122
Sensibilidad	100%		98.7%		
95% intervalos de confianza	(95% - 100%)		(93% - 100%)		
Especificidad	99.2 %		99.2%		
95% intervalos de confianza	(96% - 100%)		(96% - 100%)		
Correlación	99.5 %		99.0%		
95% intervalos de confianza	(97% - 100%)		(96% - 100%).11		

TABLA 2
Comparación del IDEIA™ Rotavirus (interpretación fotométrica) con Microscopía Electrónica y EIA.

METODO	ME		EIA		
	+	-	+	-	
IDEIA™ Rotavirus	+	77	2	77	2
	-	0	122	1	121
Sensibilidad	100 %		98.7%		
95% intervalos de confianza	(95% - 100%)		(93% - 100%)		
Especificidad	98.4%		98.4 %		
95% intervalos de confianza	(94% - 100%)		(94% - 100%)		
Correlación	99.0 %		98.5%		
95% intervalos de confianza	(96% - 100%)		(96% - 100%)		

12.3 LIMITE DE DETECCION

El límite de detección fue determinado utilizando muestras fecales que contenían rotavirus Grupo A (serotipo desconocido), con contajes por mL de partículas víricas conocidos mediante ME. Se prepararon diluciones seriadas de las muestras y fueron testadas usando el IDEIA™ Rotavirus (ver Tabla 3). Los resultados indican que una concentración de partículas de Rotavirus tan bajas como 7.8×10^5 por mL pueden detectarse mediante el ensayo IDEIA™ Rotavirus.

TABLA 3
Valores de absorbancia (A450) obtenidos con titulaciones de muestra fecal donde la presencia de rotavirus ha sido establecida.

Partículas Virales/mL (ME)	Valor medio de Lecturas de Absorbancia usando IDEIA™ Rotavirus
2.5×10^7	2.77
6.3×10^6	2.59
1.6×10^6	1.10
7.8×10^5 *	0.76
3.9×10^5	0.18
1.9×10^5	0.11

* Concentración límite de rotavirus detectada por IDEIA™ Rotavirus

12.4 PRECISION

Precisión Intraensayo

La precisión intraensayo se determinó utilizando los controles positivo y negativo y con tres muestras fecales. Cada control y muestra fue testado en un ensayo individual 32 veces t se determinó el valor medio y el coeficiente de variación (n = 32).

TABLA 4
Precisión Intraensayo del IDEIA™ Rotavirus.

Muestras Fecales	DO Media	%CV
Control Negativo	0.06	4.8
Control Positivo	1.67	4.9
Muestras fecales negativas	0.05	4.8
Muestras fecales positivas	0.39	6.0
Muestras fecales positivas	1.04	7.3

Precisión Interensayo

La precisión de interensayo se determinó utilizando los controles positivo y negativo y con tres muestras faecales. Cada muestra fue probada por separado en 38 ensayos distintos realizados por tres técnicos y se deteminaron los valores medios de absorción y el coeficiente de variación (n = 38).

TABLA 5
Precisión de Interensayo del ensayo IDEIA™ Rotavirus.

Muestras Fecales	DO Media	%CV
Negativo	0.06	7.8
Positivo	0.41	8.1
Positivo	1.10	8.5

12.5 REACTIVIDAD CRUZADA

Los siguientes microorganismos fueron probados en el ensayo Rotavirus de IDEIA™ y no mostraron ninguna reactividad cruzada. Se realizaron tests de especificidad cruzada tanto en muestras clínicas para las cuales el status microbiano había sido determinado, como en cultivos de laboratorio de organismos conocidos, que contienen aproximadamente 10^7 - 10^8 organismos viables/mL. La fuente de microorganismos viene referenciada en el apartado inferior.

VIRUS

Adenovirus 1, 2, 3, 5, 40, 41^a

Astrovirus^a

Coronavirus^a

Coxsackie virus B2, B3, B4, B5^a

Echovirus 9, 11, 18, 22, 32^a

Enterovirus^a

Polio virus tipos 1, 2 y 3^a (cepas de vacuna)

Picornavirus^a

Virus de estructura pequeña y redonda^a (incluso *Calicivirus*)

BACTERIAS

Aeromonas sp

Bacillus cereus

Campylobacter spp^d

Clostridium difficile (toxina)

Clostridium perfringens (toxina)^a

Clostridium spp^c

Corynebacterium sp

Escherichia coli

Enteropathogenic E. coli

Enterotoxigenic E. coli

Lactobacillus spp

Legionella spp^c

Listeria monocytogenes

Plesiomonas shigelloides

Pseudomonas aeruginosa

Salmonella agona

Salmonella enteritidis

Salmonella typhimurium

Salmonella virchow^a

Shigella dysenteriae

Shigella flexneri^a

Shigella sonnei^d

Staphylococcus aureus (proteína A que produce tipo Cowan)

Streptococcus grupo A

Vibrio alginolyticus

Vibrio cholerae

Vibrio haemolyticus

PROTOZOOS

Cryptosporidium sp^a

Entamoeba histolytica^a

Giardia lamblia^a

Pneumocystis carinii^b

OTROS MICROORGANISMOS

Candida albicans^c

Trichuris trichiura^a

Apartado:

^a microorganismos presentes y testados en heces

^b Material de biopsia

^c Microorganismos desarrollados en medio de cultivo sólido

^d Microorganismos testados tanto en heces como en caldo de cultivo

Todos los demás microorganismos fueron testados en caldo de cultivo.

13 REFERENCES/REFERENZEN/BIBLIOGRAFIA

1. Francki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.L. and Brown F. (1992)
Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology Supplement 2.
Springen Verlag. New York. pp140 -144
2. Estes M.K. and Cohen J. (1989)
Rotavirus Gene Structure and Function.
Microbiological Reviews 53: 410-419
3. Bishop R.F., Davidson G.P., Holmes I.H. and Ruck B.J, (1974)
Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis.
Lancet i: 149-151
4. Kapikian A.Z., Yolken R.H., Greenberg H.B., Wyatt R.G., Kalica A.R., Chanock R.M. and Kim H.W. (1980)
Gastroenteritis viruses. In Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 5th Ed., Lennette E.H., Schmidt N.J., Eds. Amer Pub. Health Assoc., Washington D.C. pp 927- 996
5. Flewett T.H. and Woode G.N. (1978)
The Rotaviruses.
Archives of Virology, 57: 1-23
6. Steinhoff M.C. (1980)
Rotavirus: The first five years.
Journal of Pediatrics, 96: 611-622
7. Blacklow N.R. and Cukor G. (1981)
Viral Gastroenteritis.
New England Journal of Medicine, 304: 397-406
8. Wenman W.M., Hinde D., Feltham S. and Gurwith M. (1979)
Rotavirus infection in Adults: Results of a Prospective Study.
New England Journal of Medicine, 301: 303-306
9. Cubitt W.D. (1982)
Rotavirus infection: An Unexpected Hazard in Units caring for the Elderly.
Geriatric Medicine Today, 1: 33-88
10. Marrie T.J., Spencer H.S., Faulkner R.S., Ethier J. and Young C.H. (1982)
Rotavirus Infection in a Geriatric population.
Archives of Internal Medicine, 142: 313-316
11. Brandt C.D., Kim H.W., Rodriguez W.J et al. (1983)
Paediatric viral gastroenteritis during eight years of study.
Journal of Clinical Microbiology, 18: 71-78.15
12. Brandt C.D., Parrot R.H., Kim H.W. and Rodriguez W.J. (1984)
Diarrhoea viruses: detection, specific identification, and epidemiology.
In Medical Virology III (eds. I. de la Maza and E. Peterson) Elsevier
New York pp 35-68
13. Kapikian A.Z. and Chanock R.M. (1985)
Rotaviruses. In Virology (eds B.N. Fields et al) Raven Press New York pp 863-906
14. Martin A.L. and Follet A.C. (1987)
An assessment of the sensitivity of three methods for the detection of Rotavirus.
Journal of Virological Methods, 16: 39-44

15. Kalica A.R., Purcell R.H., Sereno M.M. et al (1977)
A microtitre solid phase radioimmunoassay for detection of human reovirus like agent in stools.
Journal of Immunology, 118: 1275-1279
16. Herring A.J., Inglis N.F., Ojeh C. et al (1982)
Rapid diagnosis of Rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silverstained polyacrylamide gels.
Journal of Clinical Microbiology, 16 :473-477
17. Pyndiah N., Beguin R., Richard J., Charles M., Rey A. and Bonifas V. (1988)
Accuracy of Rotavirus diagnosis: Modified genome electrophoresis versus electron microscopy.
Journal of Virological Methods, 20 :39-44
18. Grauballe P.C., Vestergaard B.F., Meyling A. and Genner J. (1981)
Optimised enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human and bovine Rotavirus in stools: comparison with electron microscopy, immunoelectrophoresis, and fluorescent antibody techniques.
Journal of Medical Virology, 7: 29-40
19. Coulson B.S. and Holmes I.H. (1984)
An Improved Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Rotavirus in Faeces of Neonates.
Journal of Virology Methods, 8: 165-179
20. Cukor G., Perron D.M., Hudson R. and Blacklow N.R. (1984)
Detection of Rotavirus in Human Stools by Using Monoclonal Antibody.
Journal of Clinical Microbiology, 19: 888-892
21. Herrmann J.E., Blacklow N.R., Perron D.M., Cukor G., Krause P.J., Hyams J.S., Barrett H.J. and Ogra P.L. (1985)
Monoclonal Antibody Enzyme Immunoassay for Detection of Rotavirus in Stool Specimens.
Journal of Infectious Disease, 152: 830-832
22. Holland V.R. (1974)
Safer Substitute for Benzidine in Detection of Blood.
Tetrahedron, 30: 3299-3302

(c) DAKO Ltd 1999

ANEXO 2

Diccionario para la entrada de datos a la base de datos.

FICHA DE REPORTE DE CASOS

{Q1} Centro Centinela:

- [1] IMT: Instituto de Medicina Tropical
- [2] IPS: Instituto de Prevision Social
- [3] HNI: Hospital Nacional de Itagua
- [4] HGP: Hospital Pediatrico Acosta Ñu
- [5] CMI: Centro Materno Infantil Hosp. Clinicas
- [6] Otros

{Q2} Semana: Epidemiológica

{Q3} Año: Ejemplo: 2004

{Q4} Iniciales:

Ingrese las letras iniciales de los primeros dos nombres y primeros dos apellidos (cuatro letras) del caso.

Nota: para participantes que no cuentan con dos nombres y dos apellidos, digitar * (asterisco) en el espacio que corresponde a la inicial faltante.

Ejemplos:

Para: Juan José Ramírez Gonzáles, digitar JJRG

Para: Juan José Ramírez, digitar JJR*

Para: Juan Ramírez Gonzáles, digitar J*RG

{Q5} Nac:

Ingrese el día, mes y año (dd/mm/yyyy) de nacimiento del caso

{Q6} Sexo:

- [1] Masculino
- [2] Femenino

{Q7} Fecha de ingreso:

Ingrese día, mes y año (dd/mm/yyyy) de admisión del caso en la sala

{Q8} Numero de expediente/ficha clínica:

Por favor ingrese el número de la ficha clínica del paciente

INFORMACION DEL PACIENTE

{Q9} Barr:

Ingrese el barrio de residencia del caso

{Q10} Ciudad:

Ingrese la ciudad de residencia del caso

{Q11} Depart:

Ingrese el departamento de residencia del caso

- [1] Concepción
- [2] San Pedro
- [3] Cordillera
- [4] Guairá
- [5] Caaguazú
- [6] Caazapá
- [7] Itapúa
- [8] Misiones
- [9] Paraguari
- [10] Alto Paraná
- [11] Central
- [12] Ñeembucú
- [13] Amambay
- [14] Canindeyú
- [15] Presidente Hayes
- [16] Alto Paraguay
- [17] Boquerón
- [18] Asunción
- [19] Otros

{Q12} Hora de ingreso:

Ingrese la hora (hs:min) en la que el caso es hospitalizado

{Q13} Hospitalizado en:

- [1] Urgencia
- [2] Sala

{Q14} Peso:

Ingrese el peso en Kg.

{Q15} Talla:

Ingrese la talla en cm.

{Q16} Temperatura en admisión:

Ingrese la temperatura del paciente en grados centígrados al momento de la admisión

{Q17A}, Vómito:

- [1] Si
- [2] No
- [3] Incompleto
- [9] No sabe

{Q17B}, {Q17C} Episodios/24 hs y duración (Episo. Vom. 24hs.):

Si el paciente presenta vómito (Si a Q17A), ingrese el número de episodios en las últimas 24 horas previas a la admisión y la duración en días de estos episodios, incluyendo los producidos durante la internación.

{Q18A} Diarrea:

- [1] Si
- [2] No
- [3] Incompleto
- [9] No sabe

{Q18B}, {Q18C} Episodios/24 hs y duración (Episo. Diar. 24hs.):

Si el paciente presenta diarrea (Si a Q18A), ingrese el número de episodios en las últimas 24 horas previas a la admisión y la duración en días de estos episodios, incluyendo los producidos durante la internación.

{Q19} Plan AIEPI:

- [1] plan A
- [2] plan B
- [3] plan C
- [4] ninguno
- [5] Incompleto

{Q20} Grado de deshidratación:

- [1] Leve
- [2] Moderado
- [3] Grave
- [4] Incompleto

{Q21A} Co-morbilidades:

- [1] Si
- [2] No

{Q21B} cuales:

Ingrese el/los diagnóstico/s adicional/es registrado/s en la ficha.

{R1} Nombre de responsable:

Ingrese el nombre de la persona que completo esta parte de la ficha.

EGRESOS

{Q22} Fecha de resolución de diarrea:

Ingrese el día, mes y año (dd/mm/yyyy) en el que el cuadro diarreico se resolvió

{Q23} Salida al alta:

- [1] Sobrevivió
- [2] Murió
- [9] No sabe

{Q24} Fecha de alta o muerte:

Ingrese la fecha (dd/mm/yyyy) en la cual ocurrió la salida o egreso.

{Q25} Hora de alta o muerte:

Ingrese la hora (hs:min.) en la cual ocurrió la salida o egreso.

{Q26} Días de internación:

{Q7}-{Q24}

{R2} Nombre de responsable:

Ingrese el nombre de la persona que completo esta parte de la ficha.

INFORMACION DE LABORATORIO EN MUESTRA FECAL

{Q27} Muestra colectada:

- [1] Si
- [2] No
- [3] Incompleto

{Q27B} Fecha de toma de muestra:

Ingrese la fecha (dd/mm/yyyy) en la cual fue colectada la muestra

{Q28} Numero de leucocitos/campo:

Ingrese el número de leucocitos encontrados en el frotis de mucus fecal.

{Q29} Numero de hematíes/campo:

Ingrese el número de hematíes encontrados en el frotis de mucus fecal.

{Q30A} Bacteria identificada:

- [1] Si
- [2] No
- [8] No se realizó
- [9] No sabe

{Q30B} Que bacteria?:

- [1] Salmonella
- [2] Salmonella typhoide
- [3] Shigella
- [4] Cholera
- [5] Campylobacter
- [6] Otro
- [7] Mas de un tipo
- [9] No sabe

{Q31A}Parasitos identificados:

- [1] Si
- [2] No
- [8] No se realizó
- [9] No sabe

{Q31B} Que parasito?:

- [1] Ascaris
- [2] Giardia
- [3] Amoeba
- [4] Cryptosporidium
- [6] Otro
- [7] Mas de un tipo
- [9] No sabe

{Q32A} Resultado de Rotavirus:

- [1] Positivo
- [2] Negativo
- [9] Indeterminado
- [3] Incompleto

{Q32B} Que método?:

- [1] EIA
- [6] Otro
- [9] No sabe

{R3} Nombre de responsable:

Ingrese el nombre de la persona que completo esta parte de la ficha.

En este punto, Usted ha terminado de llenar los datos correspondientes a este caso.

ANEXO 3

Dar más líquidos para la diarrea y continuar alimentándolo

Plan A: TRATAR LA DIARREA EN CASA

ENSEÑAR A LA MADRE LAS TRES REGLAS DEL TRATAMIENTO EN LA CASA: DARLE MÁS LÍQUIDOS, CONTINUAR ALIMENTÁNDOLO Y CUÁNDO REGRESAR:

1. DARLE MAS LIQUIDOS (todo lo que el niño o niña acepte)

. DAR LAS SIGUIENTES INSTRUCCIONES A LA MADRE:

- Darle el pecho con frecuencia, durante más tiempo cada vez.
- Si el niño o niña se alimenta exclusivamente de leche materna, darle líquidos habituales incluyendo agua de arroz, caldos caseros, o agua potable.

Es especialmente importante dar Suero de Rehidratación Oral (SRO) en casa:

- Si durante esta consulta el niño o niña recibió el tratamiento con el plan B o C.
- Si el niño o niña no podrá volver al servicio de salud y la diarrea empeora;
- ENSEÑAR A LA MADRE A PREPARAR LA MEZCLA Y A DAR SRO o SUERO CASERO.
- ENTREGARLE DOS PAQUETES DE SRO PARA USAR EN CASA.
- MOSTRAR A LA MADRE LA CANTIDAD DE LIQUIDOS QUE DEBE DARLE AL NIÑO O NIÑA EN CASA ADEMAS DE LOS LIQUIDOS QUE LE DA HABITUALMENTE.

**Menor de 2 años: 50 a 100 cc. después de cada evacuación acuosa.
Myor de 2 años: 100 a 200 cc. después de cada evacuación acuosa.**

Dar las siguientes instrucciones a la madre:

- Administrar frecuentemente pequeños sorbos de líquido con una taza, vaso o cucharita.
- Si el niño o niña vomita, esperar 10 minutos y después continuar, pero más lentamente.
- Continuar dando más líquidos hasta que la diarrea pare.

2. CONTINUAR ALIMENTANDOLO

3. CUANDO VOLVER



**Consultar el cuadro.
Aconsejar a la madre
o al acompañante.**

Plan B: TRATAR LA DESHIDRATACION CON SRO

Administrar durante cuatro horas, en el servicio de salud, la cantidad recomendada de SRO.

- DETERMINAR LA CANTIDAD DE SRO QUE DEBERA ADMINISTRARSE DURANTE LAS PRIMERAS CUATRO HORAS.

EDAD	< de 4 meses	4 a 12 meses	1 a 2 años	2 a 4 años
PESO	< 6 Kg	6 < 10 Kg	10 < 12 Kg	12 - 19 Kg
En ml	200 - 400 ml	400 - 700 ml	700 - 900 ml	900 - 1400 ml

(*) Utilizar solamente la edad del niño o niña si no se conoce el peso. La cantidad aproximadamente de SRO necesaria (en ml) también puede calcularse multiplicando el peso del niño o niña (en Kg.) por 75.

- Si el niño o niña quiere más SRO que la cantidad indicada, darle más.

* MUESTRE A LA MADRE COMO SE ADMINISTRA LA SOLUCION DE SRO.

- Dar con frecuencia pequeños sorbos de líquido con una tasa y cuchara.
- Si el niño o niña vomita, esperar 10 minutos y después continuar, pero más lentamente.
- Continuar dándole el pecho siempre que el niño o niña lo desee.

* CUATRO HORAS DESPUÉS:

- Reevaluar al niño o niña y clasificar la deshidratación.
- Seleccionar el plan aprobado para continuar el tratamiento.
- Comenzar a alimentar al niño o niña en el servicio de salud tan pronto lo desee.

* SI LA MADRE TIENE QUE IRSE ANTES QUE SE TERMINE DE ADMINISTRAR EL TRAMIENTO:

- Enseñarle a preparar la solución de SRO en la casa.
- Demostrarle la cantidad de SRO que debe administrar para terminar las cuatro horas de tratamiento en la casa.
- Entregarle suficientes sobres de SRO para terminar la rehidratación.
- Entregarle también dos sobres tal como se recomienda en el Plan A.
- Explicarle las tres reglas del tratamiento en la casa.

1. DARLE MAS LIQUIDOS

2. CONTINUAR ALIMENTANDOLO

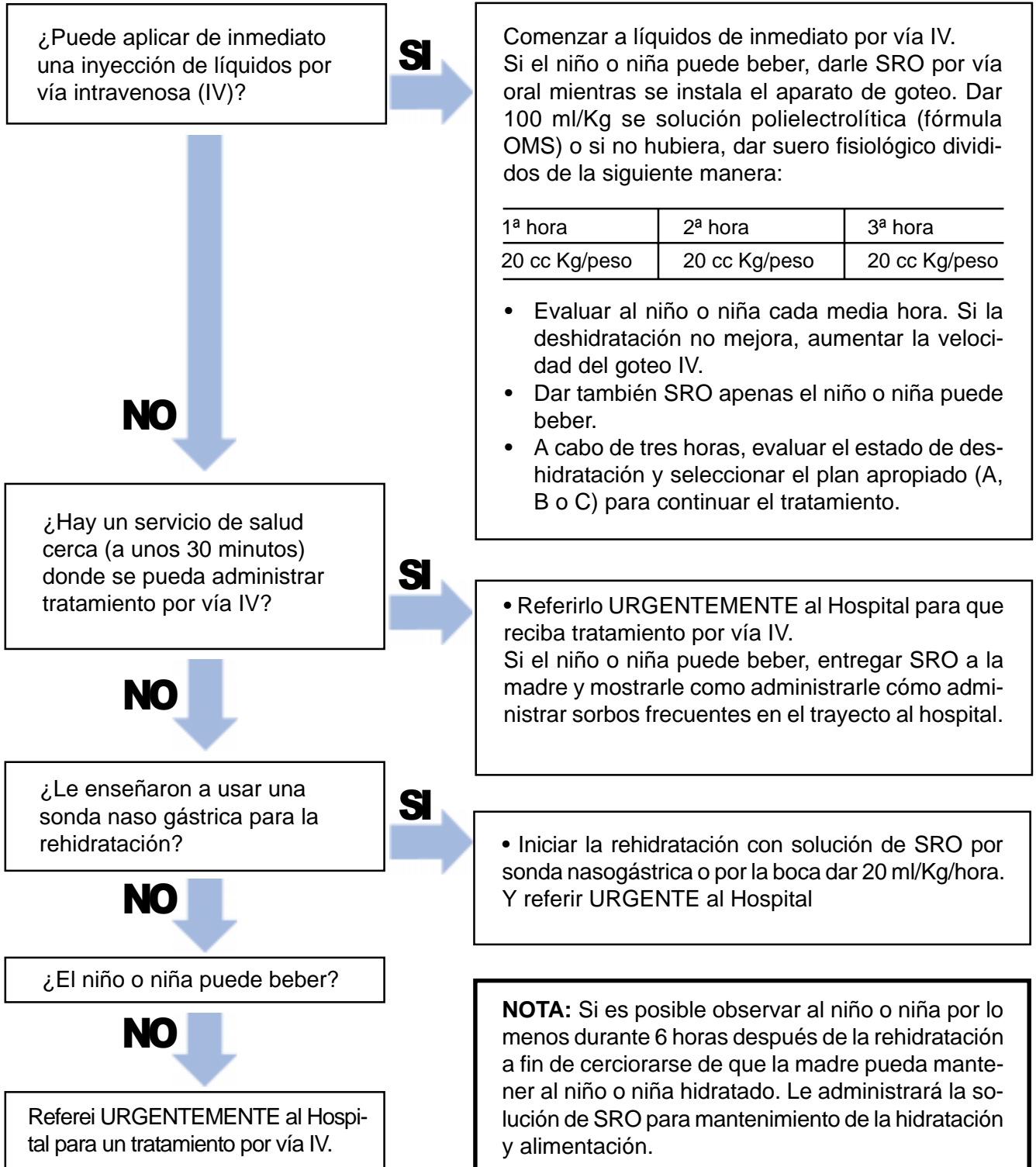
3. CUANDO REGRESAR



Consultar el Plan A para los líquidos recomendados y consultar el cuadro. Aconsejar a la madre o al acompañante.

Plan C: TRATAR LA DIARREA EN CASA

Seguir las flechas, si la respuesta es afirmativa, ir hacia la derecha: si la respuesta es negativa, ir hacia abajo.



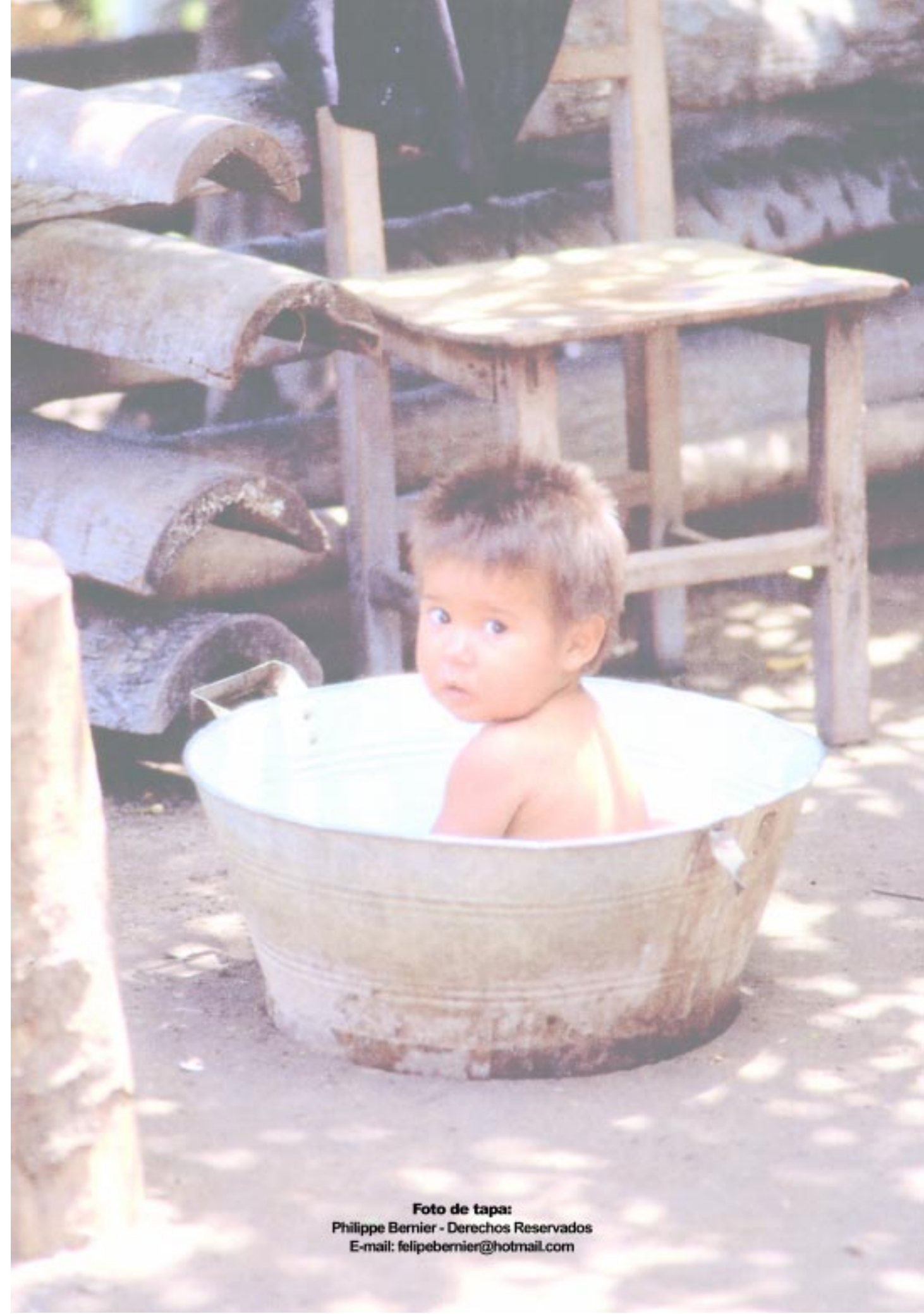


Foto de tapa:
Philippe Bernier - Derechos Reservados
E-mail: felipebernier@hotmail.com