

RIDA® UNITY Norovirus I & II

REF UN1415



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Německo

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Účel použití

K diagnostickému použití *in vitro*. Test RIDA®UNITY Norovirus I & II prováděný na platformě RIDA®UNITY je metoda s multiplex real-time RT-PCR testem pro přímou kvalitativní detekci a diferenciaci RNA norovirů genoskupin I (GI) a II (GII) v neupravených vzorcích lidské stolice osob vykazujících známky a příznaky akutní gastroenteritidy.

Test RIDA®UNITY Norovirus I & II je určen k podpoře diferenciální diagnostiky infekcí způsobených noroviry genoskupiny I (GI) a II (GII) u pacientů s příznaky gastroenteritidy ve spojení s dalšími klinickými a laboratorními nálezy.

Negativní výsledky nevylučují norovirovou infekci a nesmí sloužit jako jediný podklad pro stanovení diagnózy.

Tento produkt je určen k profesionálnímu použití.

2. Souhrn a vysvětlení testu

Noroviry jsou jednou z nejčastějších příčin nebakteriálních gastroenteritid na světě u lidí všech věkových skupin a každoročně způsobují přibližně 70 000 až 200 000 úmrtí.⁽¹⁾ Způsobují přibližně 20 % všech případů akutní gastroenteritidy na celém světě. Lidské noroviry, dříve známé jako viry Norwalk, byly poprvé identifikovány v roce 1972 ve vzorcích stolice odebraných během epidemie gastroenteritidy ve městě Norwalk v Ohio v USA. Staly se tak prvními virovými patogeny, u nichž bylo prokázáno, že způsobují gastroenteritidu.⁽²⁾

Noroviry patří do čeledi *Caliciviridae* a jsou to malé neobalené viry s jednovláknovou RNA (ssRNA). Na základě genetických sekvencí virové RNA-dependentní RNA polymerázy a kapsidového proteinu jsou noroviry rozděleny do 10 genoskupin (GI až GX) s více než 49 různými genotypy (9× GI, 27× GII, 3× GIII, 2× GIV, 2× GV, 2× GVI a po 1 genotypu pro GVII, GVIII, GIX [dříve GII.15] a GX) a různých kmenů.

Z hlediska lidské patogenity jsou nejdůležitější genoskupiny I, II a někdy IV.⁽¹⁾ V USA je více než 99 % všech norovirových epidemií způsobeno viry GI a GII.⁽³⁾

Gastroenteritida zapříčiněná noroviry je často způsobena přítomností virionů ve výkalech a zvracích, přičemž k vyvolání onemocnění stačí pouhých 10 infekčních částic. Vysoká stabilita v prostředí a nízká infekční dávka jsou příčinou toho, že noroviry jsou vysoce přenosné.⁽⁴⁾ Typickými příznaky norovirových infekcí jsou průjem, zvracení a nevolnost.⁽³⁾

3. Princip testu

Multiplex real-time RT-PCR test RIDA®UNITY Norovirus I & II je molekulární diagnostické PCR k přímé kvalitativní detekci a diferenciaci RNA norovirů genoskupiny I (GI) a norovirů genoskupiny II (GII) a RNA GIV ve vzorcích lidské stolice. Zpracování je plně automatizováno pomocí systému RIDA®UNITY System. Nukleové kyseliny se nejprve extrahují pomocí soupravy RIDA®UNITY Universal Extraction Kit a Internal Control Kit. Cílová sekvence se detekuje v jedнокrokovém real-time RT-PCR formátu, což znamená, že reverzní transkripce (RT) a následné PCR se provádí v jedné reakční lahvičce. Při tomto procesu se izolovaná RNA přepisuje do cDNA pomocí reverzní transkriptázy. Genové fragmenty specifické pro norovirus GI a GI/GIV se poté amplifikují pomocí real-time PCR.

Amplifikované cílové sekvence (oblast spojení ORF1/ORF2) se detekují pomocí hydrolyzačních sond, které jsou na jednom konci označeny zhášedčem a na druhém konci fluorescenčním reportérovým barvivem (fluoroforem). SONDY za přítomnosti cílové sekvence hybridizují s amplikonem. Taq polymeráza během extenze oddělí reportér od zhášedče. Reportér emituje fluorescenční signál, který je detekován optickou jednotkou přístroje pro real-time PCR. Fluorescenční signál se zvyšuje s množstvím vytvořených amplikonů. Aby bylo možné zkontrolovat přípravu vzorku a/nebo případnou PCR inhibici, musí být současně použita souprava RIDA®UNITY Internal Control Kit.

4. Dodávaná činidla

Činidla v soupravě vystačí na 96 stanovení.*

Tabulka 1: Dodávaná činidla

REF	Činidlo	Množství		Barva víčka
UNZ1415RM	Reaction Mix	1×	1935 µL	žlutá, připraveno k použití
UNZ1415EM	Enzyme Mix	1×	350 µL	červená, připraveno k použití
UNZ1415PC	Positive Control	1×	200 µL	modrá, připraveno k použití
UNZ1415NC	Negative Control	1×	450 µL	bílá, připraveno k použití

*Při opakovaném použití a v menších sériích se může počet reakcí snížit.

5. Pokyny k uskladnění

- Dodržujte pokyny k manipulaci uvedené v tabulce 2 a uskladněte soupravu bezprostředně po použití v souladu s uvedenými informacemi.
- Všechna činidla musí být uskladněna mimo dosah světla, při teplotě -16 až -28 °C. Pokud zůstanou neotevřená, lze je používat až do data použitelnosti vytištěného na štítku. Po uplynutí data použitelnosti přestává platit záruka kvality.
- Všechna činidla je třeba před použitím důkladně rozmrazit (např. v chladničce při teplotě 2 - 8 °C).
- Opakované zmrazení a rozmrazení až 8krát neovlivní vlastnosti testu.

Tabulka 2: Podmínky uskladnění a související informace

	Teplota pro uskladnění	Maximální doba uskladnění
neotevřené	-16 až -28 °C	Lze používat do vytištěného data použitelnosti.
otevřené	-16 až -28 °C	8 cyklů zmrazení a rozmrazení

6. Potřebná činidla, která nejsou součástí dodávky

Multiplex real-time RT-PCR test RIDA®UNITY Norovirus I & II je určen výhradně k použití se systémem RIDA®UNITY System. Ke správnému použití jsou bezpodmínečně nutné následující produkty:

6.1 Činidla

K provedení testu RIDA®UNITY Norovirus I & II jsou potřeba následující činidla:

Činidla	Číslo položky
Souprava RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
Souprava RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Laboratorní vybavení

K provedení testu RIDA®UNITY Norovirus I & II je potřeba následující vybavení:

Vybavení
Systém RIDA®UNITY System; číslo položky: ZUNITY (R-Biopharm AG)
Spotřební materiál RIDA®UNITY (špičky, destičky, reakční lahvičky, fólie). Viz pokyny k použití systému RIDA®UNITY System, informace pro objednání spotřebního materiálu
Vortex
Stolní odstředivka
Jednorázové rukavice bez pudru
Externí cykler (možné vylepšení systému)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Soupravu RIDA®UNITY Norovirus I & II lze použít ve spojení s jinými kompatibilními cyclery. Alternativní přístroje pro real-time PCR musí být ověřeny/validovány uživatelem. Chcete-li ověřit kompatibilitu, kontaktujte společnost R-Biopharm AG na adrese pcr@r-biopharm.de.

7. Varování a bezpečnostní opatření pro uživatele

K diagnostickému použití *in vitro*.

Tento test smí provádět výhradně kvalifikovaný laboratorní personál. Dodržujte pokyny pro práci ve zdravotnických laboratořích.

Při provádění tohoto testu vždy striktně dodržujte pokyny k použití.

Nepipetujte vzorky ani činidla ústy. Zabraňte kontaktu s poškozenou pokožkou a sliznicemi.

Při manipulaci s činidly a vzorky používejte osobní ochranné prostředky (vhodné rukavice, laboratorní plášť, ochranné brýle) a po dokončení testu si umyjte ruce.

V místech, kde se manipuluje se vzorky, nekuřte, nejezte ani nepijte.

Vyhnete se kontaminaci vzorků a součástí soupravy mikroby a nukleázami (DNáza/RNáza).

Na klinické vzorky se musí pohlížet jako na potenciálně infekční a je nutné je vhodně likvidovat, stejně jako všechna činidla a materiály, které přicházejí do styku s potenciálně infekčními vzorky.

Nezaměňujte ani nemíchejte součásti (reakční mix Reaction Mix, enzymový mix Enzyme Mix, pozitivní kontrola Positive Control, negativní kontrola Negative Control) jedné šarže soupravy se součástmi jiné šarže.

Testovací soupravu lze používat po dobu 8 týdnů po prvním otevření (soupravu lze znovu použít až 6krát). Nepoužívejte testovací soupravu po datu použitelnosti. Tyto specifikace jsou rovněž kontrolovány systémem RIDA®UNITY System.

Uživatelé jsou zodpovědní za správnou likvidaci všech použitých činidel a materiálů. Při likvidaci dodržujte národní předpisy.

Další podrobné informace o bezpečnostních listech (Safety Data Sheet, SDS) můžete nalézt pod číslem položky na stránkách <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Pro uživatele v Evropské unii: Veškeré závažné nežádoucí účinky související s tímto produktem nahláste společnosti R-Biopharm AG a příslušným státním orgánům.

8. Odběr a uskladnění vzorků

Za účelem dosažení co nejlepší výkonnosti testu RIDA[®]UNITY Norovirus I & II se doporučuje používat čerstvé vzorky.

Vyhňte se opětovnému zmrazování a rozmrazování vzorků.

Neodebírejte vzorky stolice do transportních nádob s obsahem transportního média s konzervačními přísadami, zvířecího séra, kovových iontů, oxidačních činidel nebo detergentů, protože takové látky mohou interferovat s testy RIDA[®]UNITY.

Aby se zabránilo opakovanému rozmrazování a zmrazování, doporučujeme připravit ze vzorků alikvoty. Zmrazené vzorky rozmrazujte bezprostředně před extrakcí, aby se zabránilo degradaci nukleové kyseliny.

Postupujte podle pokynů k uskladnění uvedených v tabulkách 3 až 6.

Tabulka 3: Uskladnění vzorků – detekce noroviru GI

Nativní vzorky – stolice		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20/-80 °C
≤ 7 dnů	≤ 9 dnů	≤ 6 měsíců

V eluátu (ze stolice)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 hodin	≤ 36 hodin	≤ 1 měsíc

Při teplotě uskladnění -20/-80 °C nemá opakované zmrazení/rozmrazení vzorku stolice provedené až 5krát vliv na vlastnosti testu.

Při teplotě uskladnění -20 °C nemá opakované zmrazení/rozmrazení eluátu (ze stolice) provedené až 3krát vliv na vlastnosti testu.

Tabulka 4: Uskladnění vzorků – detekce noroviru GII

Nativní vzorky – stolice		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20/-80 °C
≤ 7 dnů	≤ 9 dnů	≤ 6 měsíců

V eluátu (ze stolice)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 hodin	≤ 36 hodin	≤ 1 měsíc

Při teplotě uskladnění -20/-80 °C nemá opakované zmrazení/rozmrazení vzorku stolice provedené až 5krát vliv na vlastnosti testu.

Při teplotě uskladnění -20 °C nemá opakované zmrazení/rozmrazení eluátu (ze stolice) provedené až 3krát vliv na vlastnosti testu.

8.1 Příprava DNA ze vzorků stolice

K izolaci DNA ze vzorků stolice použijte soupravu RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Postupujte přesně podle návodu k použití soupravy RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (část: Příprava nukleových kyselin ze vzorků stolice).

9. Průběh testu

Vzorky a činidla soupravy RIDA®UNITY Norovirus I & II umístěte do systému RIDA®UNITY System.

Předtím pomocí vortexu dostatečně promíchejte reakční směs **Reaction Mix**, negativní kontrolu **Negative Control** a pozitivní kontrolu **Positive Control**.

Enzymový mix **Enzyme Mix** ve vortexu nepromíchejte. Poté všechny součásti krátce odstředěte.

PCR zkumavky pro vyšetřované vzorky musí být předem umístěny v integrovaném PCR cykleru.

Ke správnému naplnění systému činidly a spotřebním materiálem jsou k dispozici přenosné nádoby. Při plnění postupujte podle pokynů k systému RIDA®UNITY System. Dodržujte příslušné části v příručce pro systém RIDA®UNITY System (část: Provedení cyklu).

Test RIDA®UNITY Norovirus I & II lze použít pouze v kombinaci se soupravou RIDA®UNITY Internal Control Kit. To umožňuje včas rozpoznat potenciální PCR inhibici, ověřit integritu činidla a potvrdit úspěšnou extrakci nukleové kyseliny. Postup je popsán v návodu k použití soupravy RIDA®UNITY Internal Control Kit (část: Průběh testu).

Automatizované zpracování je popsáno v příručce pro systém RIDA®UNITY System (část: Provedení cyklu).

9.1 Nastavení prostředku

9.1.1 Univerzální profil real-time PCR

Za účelem sjednocení testů RIDA®UNITY je test RIDA®UNITY Norovirus I & II ověřován výhradně v univerzálním profilu. To umožňuje testy DNA a RNA vzájemně kombinovat. Obecně lze říci, že reverzní transkripce je tedy v univerzálním profilu na prvním místě.

Tabulka 7: Univerzální profil real-time PCR pro test RIDA®UNITY

<u>Reverzní transkripce</u>	10 min, 58 °C
Počáteční denaturace	1 min, 95 °C
Cykly	45 cyklů
<u>PCR</u> Denaturace	10 s, 95 °C
Annealing/extenze	15 s, 60 °C
Rychlost přechodové teploty / teplotního náběhu	Maximální

Poznámka: Annealing a extenze probíhají ve stejném kroku.

Tabulka 8: Univerzální profil real-time PCR pro přístroj CFX96™ Dx

<u>Reverzní transkripce</u>	10 min, 58 °C
Počáteční denaturace	1 min, 95 °C
Cykly	45 cyklů
<u>PCR</u> Denaturace	15 s, 95 °C
Annealing/extenze	30 s, 60 °C
Rychlost přechodové teploty / teplotního náběhu	Maximální

Poznámka: Annealing a extenze probíhají ve stejném kroku.

9.2 Nastavení detekčního kanálu

Tabulka 9: Výběr vhodných detekčních kanálů

Přístroj pro real-time PCR	Detekce	Detekční kanál	Poznámka
R-Biopharm RIDA®UNITY	Norovirus GII	FAM	SEEK, kanál GGII
	Interní kontrola	HEX	SEEK, kanál ICD
	Norovirus GI	Cy5	SEEK, kanál GGI
Bio-Rad CFX96™ Dx	Norovirus GII	FAM	SEEK, kanál GGII
	Interní kontrola	VIC	SEEK, kanál ICD
	Norovirus GI	Cy5	SEEK, kanál GGI

10. Kontrola kvality – známky nestability nebo expirace činidel

Vzorky se vyhodnocují pomocí analytického softwaru RIDA®SEEK v systému RIDA®UNITY System. Negativní kontrola **Negative Control** a pozitivní kontrola **Positive Control** musí vykazovat správné výsledky (viz tabulka 9).

Pozitivní kontrola **Positive Control** je k dispozici v koncentraci 10^3 kopií/ μ L. V každém PCR cyklu se používá v celkovém množství 5×10^3 kopií.

Negativní kontrola **Negative Control** již obsahuje interní kontrolu RIDA®UNITY Internal Control. Protože kontroly neobsahují templát, nelze v cílových kanálech očekávat žádné signály. Zásadní jsou však pozitivní signály v kanálu IC, kterým je detekována interní kontrola (viz tabulka 10).

Tabulka 10: Platný cyklus PCR musí splňovat následující podmínky:

Vzorek	Výsledek	Ct IC	Ct cílového genu
Pozitivní kontrola	+	Neuplatňuje se*	Viz osvědčení o analýze (Certificate of Analysis, CoA)
Negativní kontrola	-	Ct > 20	0

*Za jistých okolností může mít kanál IC pozitivní signál v pozitivní kontrole, a proto nemá být hodnocen.

Pokud pozitivní kontrola není ve stanoveném rozsahu Ct, ale negativní kontrola je platná, je třeba znovu pomocí PCR analyzovat všechny reakce, včetně kontrol.

Pokud negativní kontrola není negativní, ale pozitivní kontrola je platná, je třeba znovu pomocí PCR analyzovat všechny reakce, včetně kontrol.

Pokud není dosaženo stanovených hodnot, před zopakováním testu zkontrolujte následující body:

- Datum použitelnosti použitých činidel,
- Funkčnost používaného vybavení,
- Správný průběh testu.

Pokud nejsou požadované podmínky splněny ani po zopakování testu, obraťte se na výrobce nebo místního distributora společnosti R-Biopharm.

11. Hodnocení a interpretace

Vyhodnocení a interpretace vzorků se provádí pomocí analytického softwaru RIDA®SEEK v systému RIDA®UNITY System.

V současné době neexistuje žádná mezinárodně uznávaná referenční metoda ani referenční materiál pro standardizaci. Kontrolní materiály lze metrologicky sledovat podle interních standardů společnosti R-Biopharm AG na základě specifických syntetických amplikonů RNA.

Máte-li zájem o další informace týkající se metrologické sledovatelnosti, obraťte se na společnost R-Biopharm AG.

Specifikované hodnoty, rozsahy a další podrobné údaje jsou uvedeny v osvědčení o analýze (Certificate of Analysis, CoA).

Tabulka 11: Interpretace výsledků*

Detekce			
Norovirus GII	Norovirus GI	IC	Výsledek
+	-	+/-	Detekovatelný norovirus GII ¹
-	+	+/-	Detekovatelný norovirus GI
+	+	+/-	Detekovatelný norovirus GII ¹ a norovirus GI
-	-	+	Cílové geny nejsou detekovatelné
-	-	-	Neplatný

*+ = pozitivní

- = negativní

¹Viz část Omezení metody (část 10).

Vzorek je pozitivní, pokud RNA vzorku a interní kontrola **Internal Control** vykazují v detekčním systému signál amplifikace.

Vzorek je rovněž pozitivní, pokud RNA vzorku vykazuje signál amplifikace, ale v detekčním systému není vidět žádný signál amplifikace pro interní kontrolu **Internal Control**. Detekce interní kontroly **Internal Control** není v tomto případě nutná, protože vysoké koncentrace amplikonů mohou způsobit slabý nebo žádný signál interní kontroly **Internal Control**.

Vzorek je negativní, pokud RNA vzorku nevykazuje signál amplifikace, ale v detekčním systému je viditelný signál amplifikace pro interní kontrolu **Internal Control**. Detekcí interní kontroly **Internal Control** lze vyloučit inhibici PCR reakce a předchozí extrakci.

Vzorek je neplatný, pokud RNA vzorku ani interní kontrola **Internal Control** nevykazují v detekčním systému signál amplifikace. Ve vzorku jsou přítomny inhibitory nebo došlo k chybě při extrakci.

12. Omezení metody

1. Test RIDA[®]UNITY Norovirus I & II detekuje RNA norovirů GI a norovirů GII v neupravených vzorcích lidské stolice. Na základě tohoto testu nelze vyvodit souvislost mezi vyšší stanovené hodnoty Ct a výskytem závažných klinických příznaků. Získané výsledky je vždy nutné interpretovat v kombinaci se všemi klinickými příznaky.
2. Diagnózu nelze stanovit pouze na základě výsledku molekulárně biologické analýzy. Vždy je potřeba brát v potaz anamnézu a příznaky pacienta.
3. Tento test je schválen pouze pro automatizované zpracování pomocí systému RIDA[®]UNITY System.
4. Tento test byl ověřen a validován pouze pro vzorky stolice.
5. Nesprávný odběr, přeprava a uskladnění vzorků a manipulace s nimi nebo zatížení patogeny, které je nižší než analytická citlivost testu, může způsobit falešně negativní výsledky.
6. Přítomnost inhibitorů PCR může vést k falešně negativním nebo neplatným výsledkům.
7. Stejně jako u všech diagnostických testů *in vitro* založených na PCR lze detekovat extrémně nízké koncentrace cílových sekvencí, které jsou pod limitem detekce (LoD 95 %). Získané výsledky nejsou vždy reprodukovatelné.
8. Při použití testu RIDA[®]UNITY Norovirus I & II mohou mutace nebo polymorfismy v primerech nebo vazebných místech sond narušit detekci nových nebo neznámých variant a být příčinou falešně negativních výsledků.
9. Pozitivní výsledek testu nemusí nutně znamenat přítomnost životaschopných organismů. Pozitivní výsledek znamená, že jsou přítomny cílové geny (norovirus GI a GII, oblast spojení ORF1/ORF2).
10. Noroviry genoskupiny IV, které ve velmi vzácných případech mohou infikovat člověka, jsou také detekovány pomocí testu RIDA[®]UNITY Norovirus I & II.
11. Tento test musí být proveden v souladu s nařízením o správné laboratorní praxi (SLP). Při provádění testu musí uživatelé postupovat přesně podle pokynů výrobce.

13. Charakteristiky provedení

13.1 Klinické charakteristiky provedení

Test RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time PCR byl v externí laboratoři porovnán s referenčním testem s označením CE. Použito bylo 237 vzorků stolice od pacientů s příznaky gastrointestinální infekce.

Výsledky ukazují vysokou citlivost a specifitu k detekci norovirů GI nebo GII ve vzorcích lidské stolice.

Tabulka 12: Detekce noroviru GI

		Referenční PCR		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
RIDA®UNITY Norovirus I & II – Norovirus GI	Pozitivní	33	0	33
	Negativní	3	201	204
	Celkem	36	201	237

Relativní citlivost (95% IS)	91,7 % (77,5 % - 98,2 %)
Relativní specifita (95% IS)	100 % (98,2 % - 100 %)

Tabulka 13: Detekce noroviru GII

		Referenční PCR		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
RIDA®UNITY Norovirus I & II – Norovirus GII	Pozitivní	126	0	126
	Negativní	4	107	111
	Celkem	130	107	237

Relativní citlivost (95% IS)	96,9 % (92,3 % - 99,2 %)
Relativní specifita (95% IS)	100 % (96,6 % - 100 %)

13.2 Analytické charakteristiky provedení

13.2.1 Limit detekce (LoD 95%)

Za účelem stanovení hodnoty LoD byl pozitivní vzorek (negativní pool stolice obohacený pozitivními klinickými vzorky stolice) měřen v pěti krocích ředění (v krocích po 0,25 log) pro každý cíl s 20 replikáty pro každý krok v jedné šarži. Poté následovala probitová analýza. Dále byla vypočtená hodnota LoD potvrzena pomocí 20 replikátů pro každý cíl pro vypočtený krok ředění / koncentraci.

Pro detekci RNA noroviru GI a noroviru GII pomocí testu RIDA®UNITY Norovirus I & II v systému UNITY System byly stanoveny následující limity detekce (LoD). Výsledky provedených měření jsou uvedeny v tabulce 15.

Tabulka 15: Výsledky limitu detekce testu RIDA®UNITY Norovirus I & II pro parametry noroviru GI a noroviru GII ve vzorcích stolice

	Norovirus GI	Norovirus GII
LoD	4,85E-04 [faktor ředění]**	5,98E-05 [faktor ředění]*

(*) Relativní ředění základní koncentrace. Pozitivní klinický vzorek s rozsahem Ct 26 - 27.

(**) Relativní ředění základní koncentrace. Pozitivní klinický vzorek s rozsahem Ct 30 - 31.

Hodnota LoD pro parametr noroviru GI ve vzorcích stolice byla stanovena na 4,85E-04 [faktor ředění].

Hodnota LoD pro parametr noroviru GII ve vzorcích stolice byla stanovena na 5,98E-05 [faktor ředění].

Za účelem vylepšení pracovního postupu využívajícího přístroj CFX96™ Dx byly tyto hodnoty LoD potvrzeny za předpokladu, že zůstaneme v 2-3násobném rozmezí LoD.

13.2.2 Analytická specifita

Interferující látky

Přítomnost inhibitorů PCR a interferujících látek může být příčinou falešně negativních nebo neplatných výsledků. Proto byly zkoumány účinky různých látek, ke kterým může dojít z důvodu jejich rozšířeného používání při gastrointestinálních infekcích nebo jejich častého výskytu v příslušných vzorcích.

Látky, které by mohly potenciálně významně ovlivnit výsledky testu, byly nejprve zkoumány ve vysokých koncentracích (trojnásobek denní dávky nebo simulace nejhoršího případu) v rámci screeningu interferencí.

U látek uvedených v tabulce 16 nebyla zjištěna žádná interference.

Tabulka 16: Potenciálně interferující látky

Potenciálně interferující látka	Koncentrace
Ciprofloxacin-ratiopharm® potahované tablety 500 mg (ciprofloxacin)	0,375 % [w/v]
Etanol	5 % na bázi eluátu
Guanidin hydrochlorid	5 % na bázi eluátu
Lidská krev	5 % [v/v]
Hleny	5 % [w/v]
Kyselina stearová/palmitová	40 % [w/v]

Zkřížené reakce

Byly zkoumány různé organismy (bakterie, paraziti a viry), které se běžně vyskytují v matrici stolice. Mikroorganismy zkoumané v rámci tohoto testu byly vybrány proto, že se buď přirozeně vyskytují ve vzorcích stolice, nebo způsobují obdobné příznaky jako gastrointestinální patogeny. Pro tyto analýzy byly použity bakteriální kultury (mezi 10^7 a 10^9 CFU/mL) a fungální kultury nebo virové izoláty (z pozitivních vzorků stolice) pro příslušné organismy.

Test RIDA[®]UNITY Norovirus I & II multiplex real-time PCR je specifický pro norovirus GI a norovirus GII. S následujícími druhy nebyla zjištěna žádná zkřížená reaktivita (viz tabulka 17):

Tabulka 17: Potenciálně zkříženě reaktivní organismy

Organismus	Výsledek testu*	
	Norovirus GI	Norovirus GII
Adenovirus	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-
Astrovirus	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	-
<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	-
<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	-
<i>E. coli</i> (O6)	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-

Rotavirus	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (sérovar Enteritidis)	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (sérovar Typhimurium)	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-

13.2.3 Přesnost

Přesnost testu RIDA®UNITY Norovirus I & II real-time PCR byla stanovena pro následující úroveň.

Přesnost *uvnitř* testu: Stanovení 5 kontrolních vzorků s použitím vždy 20 replikátů v systému RIDA®UNITY za stejných podmínek.

Přesnost *v rámci* testů: Stanovení 5 kontrolních vzorků ve 20 cyklech v duplikátu během 10 pracovních dnů (2 cykly denně) provedená na různých přístrojích za podmínek reprodukovatelnosti.

Testování přesnosti *uvnitř* testu a *v rámci* testů bylo provedeno s použitím tří různých šarží.

Získané variační koeficienty jednotlivých měření provedených pomocí testu RIDA®UNITY Norovirus I & II real-time PCR nebyly větší než 4,82 % v systému RIDA®UNITY a nebyly větší než 3,25 % v přístroji CFX96™ Dx.

Tabulka 18: Výsledky přesnosti testu RIDA®UNITY Norovirus I & II z hlediska přítomnosti noroviru GI (systém RIDA®UNITY System)

Střední hodnota Ct / CV	Uvnitř testu			V rámci testů			V rámci šarží
	Šarže soupravy 1	Šarže soupravy 2	Šarže soupravy 3	Šarže soupravy 1	Šarže soupravy 2	Šarže soupravy 3	Šarže soupravy 1-3
1 Ct	25,6	24,1	24,3	30,5	29,6	29,4	29,8
1 CV (%)	1,27	0,58	0,97	2,97	1,51	2,16	3,04
2 Ct	29,5	29,2	29,3	29,1	28,4	28,3	28,6
2 CV (%)	0,42	1,06	0,99	3,11	2,40	2,69	3,10
3 Ct	34,8	33,3	34,1	26,4	25,5	25,4	25,8
3 CV (%)	1,11	1,00	1,44	3,01	1,77	2,40	3,14
4 Ct	33,0	33,5	31,9	29,7	28,8	28,7	29,1
4 CV (%)	1,50	1,30	0,93	3,17	2,34	2,75	3,35
5 Ct	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
5 CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

Tabulka 19: Výsledky přesnosti testu RIDA®UNITY Norovirus I & II z hlediska přítomnosti noroviru GI (přístroj CFX96™ Dx)

Střední hodnota Ct / CV	Uvnitř testu			V rámci testů			V rámci šarží	
	Šarže soupravy 1	Šarže soupravy 2	Šarže soupravy 3	Šarže soupravy 1	Šarže soupravy 2	Šarže soupravy 3	Šarže soupravy 1-3	
1	Ct	26,7	26,1	25,4	29,6	29,0	28,7	29,1
	CV (%)	0,97	0,94	0,93	2,49	1,62	1,50	2,44
2	Ct	30,3	30,0	29,6	28,2	27,4	27,2	27,6
	CV (%)	0,72	0,90	0,51	2,20	1,75	1,66	2,66
3	Ct	33,1	32,6	32,5	25,7	25,2	25,0	25,3
	CV (%)	0,81	0,74	0,82	1,91	1,40	1,48	2,13
4	Ct	32,4	31,9	31,7	28,9	28,3	28,0	28,4
	CV (%)	1,16	0,74	0,64	2,83	1,95	1,98	2,72
5	Ct	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

Tabulka 20: Výsledky přesnosti testu RIDA®UNITY Norovirus I & II z hlediska přítomnosti noroviru GII (systém RIDA®UNITY System)

Střední hodnota Ct / CV	Uvnitř testu			V rámci testů			V rámci šarží	
	Šarže soupravy 1	Šarže soupravy 2	Šarže soupravy 3	Šarže soupravy 1	Šarže soupravy 2	Šarže soupravy 3	Šarže soupravy 1-3	
1	Ct	23,4	21,7	21,7	28,4	26,9	26,8	27,4
	CV (%)	1,12	0,39	1,00	4,02	1,98	2,64	4,46
2	Ct	27,9	26,8	26,8	30,6	29,4	29,2	29,7
	CV (%)	0,76	0,77	0,75	3,42	2,33	2,64	3,69
3	Ct	33,6	31,6	32,3	23,7	22,6	22,4	22,9
	CV (%)	1,43	0,85	1,43	3,93	2,16	2,63	4,31
4	Ct	31,7	31,4	30,1	27,3	25,8	25,7	26,3
	CV (%)	1,45	1,31	0,96	4,30	2,86	3,34	4,82
5	Ct	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

Tabulka 21: Výsledky přesnosti testu RIDA®UNITY Norovirus I & II z hlediska přítomnosti noroviru GI (přístroj CFX96™ Dx)

Střední hodnota Ct / CV	Uvnitř testu			V rámci testů			V rámci šarží	
	Šarže soupravy 1	Šarže soupravy 2	Šarže soupravy 3	Šarže soupravy 1	Šarže soupravy 2	Šarže soupravy 3	Šarže soupravy 1-3	
1	Ct	24,2	23,4	22,7	27,7	27,2	26,8	27,2
	CV (%)	1,07	1,02	1,23	3,19	2,06	1,91	2,94
2	Ct	28,6	28,3	27,8	29,1	28,3	28,1	28,5
	CV (%)	0,93	0,65	0,83	2,23	1,65	1,93	2,70
3	Ct	32,0	31,4	31,2	22,9	22,4	22,2	22,5
	CV (%)	0,85	0,90	0,61	2,28	1,42	1,57	2,45
4	Ct	30,8	30,2	30,0	26,6	26,1	25,8	26,2
	CV (%)	1,11	0,69	0,85	3,25	2,27	2,23	3,03
5	Ct	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

13.2.4 Analytická reaktivita

Reaktivita testu RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time RT-PCR byla zkoumána na definovaném panelu různých genotypů norovirů z genoskupin I a II (viz tabulka 22).

Tabulka 22: Testování analytické reaktivity

Kmen	Výsledek*	
	Norovirus GII	Norovirus GI
Norovirus P31-GII4 Sydney	+	-
Norovirus GII.P4 New Orleans / GII.4 Sydney	+	-
Norovirus GII.P16-GII.4 Sydney	+	-
Norovirus GII.P16-GII.2	+	-
Norovirus GII.P31-GII.4 Sydney	+	-
Norovirus GII.7	+	-
Norovirus GI.3	-	+

*+ = pozitivní (alespoň 2 ze 3 replikátů pozitivní)










- = negativní

14. Historie verze


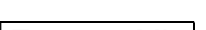
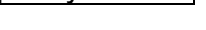

Číslo verze	Část a určení
2022-08-09	Verze vydání

15. Vysvětlení symbolů

Obecné symboly

	K diagnostickému použití <i>in vitro</i>
	Postupujte podle návodu k použití
	Číslo šarže
	Datum spotřeby
	Teplota pro uskladnění
	Číslo položky
	Počet testů
	Datum výroby
	Výrobce

Symbole specifické pro test

	Reakční mix
	Enzymový mix
	Negativní kontrola
	Pozitivní kontrola

16. Literatura

1. Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MC, Green K, Martella V, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol.* 2019;100(10):1393-406.
2. Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):134-64.
3. Barclay L, Davis T, Vinjé J. Rare Norovirus GIV Foodborne Outbreak, Wisconsin, USA. *Emerg Infect Dis.* 2021;27(4):1151-4.
4. Nordgren J, Svensson L. Genetic Susceptibility to Human Norovirus Infection: An Update. *Viruses.* 2019;11(3).