

## RIDA® UNITY Norovirus I & II

**REF** UN1415



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Deutschland

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



0123

## 1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Der RIDA®UNITY Norovirus I & II Test, welcher auf der RIDA®UNITY Plattform durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Noroviren RNA der Genogruppen I (GGI) und II (GGII) aus unbehandelten humanen Stuhlproben von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer akuten Gastroenteritis.

Der RIDA®UNITY Norovirus I & II Test ist zur Unterstützung der Differentialdiagnose von Norovirus-Infektionen der Genogruppe I (GGI) und II (GGII) bei Patienten mit Symptomen einer Gastroenteritis in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen.

Negative Ergebnisse schließen eine Norovirus-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden.

Das Produkt ist für die professionelle Anwendung vorgesehen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Noroviren sind weltweit eine der häufigsten Ursachen für nicht-bakterielle Gastroenteritis beim Menschen aller Altersgruppen und führen jährlich zu etwa 70.000 bis 200.000 Todesfällen<sup>(1)</sup>. Sie sind weltweit für etwa 20 % aller Fälle von akuter Gastroenteritis verantwortlich. Humane Noroviren, früher bekannt als Norwalk-Viren, wurde erstmals 1972 in Stuhlproben identifiziert, die während eines Ausbruchs von Gastroenteritis in Norwalk, Ohio, USA, gesammelt wurden und war somit der erste virale Erreger, der nachweislich Gastroenteritis verursacht<sup>(2)</sup>.

Noroviren gehören zur Familie der *Caliciviridae* und sind kleine, unbehüllte Viren mit einer einzelsträngigen RNA (ssRNA). Aufgrund der genetischen Sequenzen der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase sowie des Kapsidproteins werden Noroviren in die 10 Genogruppen (GGI bis GGX) mit derzeit über 49 verschiedenen Genotypen (9xGGI, 27xGGII, 3xGGIII, 2xGGIV, 2xGGV, 2xGGVI und jeweils 1 Genotyp für GGVII, GGVIII, GGIX [früher GGII.15] und GGX) und einer Vielzahl von Stämmen unterteilt. Die Genogruppen GGI, GGII und teilweise GGIV sind im Hinblick auf die Humanpathogenität am bedeutsamsten<sup>(1)</sup>. In den Vereinigten Staaten werden mehr als 99 % aller Norovirus-Ausbrüche durch GGI- und GGII-Viren verursacht<sup>(3)</sup>.

Eine durch Noroviren verursachte Gastroenteritis wird häufig durch das Vorhandensein von Virionen in Fäkalien und Erbrochenem übertragen, wobei nur 10 infektiöse Partikel erforderlich sind, um eine Krankheit zu verursachen. Die hohe Umweltstabilität und die niedrige Infektionsdosis sorgen für eine hochgradige Übertragbarkeit des Norovirus<sup>(4)</sup>. Typische Symptome einer Norovirus-Infektionen sind Durchfall, Erbrechen und Übelkeit<sup>(3)</sup>.

### 3. Testprinzip

Die RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time RT-PCR ist eine molekular-diagnostische PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Norovirus Genogruppe I (GGI) RNA und Norovirus Genogruppe II (GGII) bzw. GGIV RNA in humanen Stuhlproben. Die Abarbeitung erfolgt ausschließlich automatisiert mit dem RIDA®UNITY System. Zunächst erfolgt die Extraktion der Nukleinsäuren mithilfe des RIDA®UNITY Universal Extraction Kit und unter Verwendung des Internal Control Kits. Der Nachweis der Targetsequenz erfolgt im One-Step real-time RT-PCR Format, d. h. die reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA wird dabei mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die für Norovirus GGI und GGII/GGIV spezifischen Genfragmente werden anschließend mittels real-time PCR amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen (ORF1/ORF2 junction Region) werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können, ist eine parallele Anwendung des RIDA®UNITY Internal Control Kit nötig.

### 4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung sind ausreichend für 96 Bestimmungen\*.

**Tab. 1:** Packungsinhalt

REF	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
UNZ1415RM	Reaction Mix	1 ×	1935 µl	gelb, gebrauchsfertig
UNZ1415EM	Enzyme Mix	1 ×	350 µl	rot, gebrauchsfertig
UNZ1415PC	Positive Control	1 ×	200 µl	blau, gebrauchsfertig
UNZ1415NC	Negative Control	1 ×	450 µl	weiß, gebrauchsfertig

\* bei mehrfacher Verwendung und kleineren Serien kann sich die Anzahl der Reaktionen verringern.

## 5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Bitte folgen Sie den Handhabungsvorgaben in Tabelle 2 und lagern Sie das Kit unmittelbar nach Verwendung gemäß den aufgeführten Angaben.
- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -16 °C bis -28 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 8 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaften nicht.

**Tab. 2:** Lagerungsbedingungen und -hinweise

	Lagertemperatur	Maximale Lagerzeit
ungeöffnet	-16 °C bis -28 °C	Bis zum aufgedrucktem Verfallsdatum verwendungsfähig
geöffnet	-16 °C bis -28 °C	8 Tau-/Frier-Zyklen

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time RT-PCR Test ist ausschließlich für die Verwendung mit dem RIDA®UNITY System geeignet. Für eine korrekte Anwendung sind folgende Produkte zwingend erforderlich:

### 6.1 Reagenzien

Folgende Reagenzien werden für die Anwendung des RIDA®UNITY Norovirus I & II Tests benötigt:

Reagenzien	Artikelnummer
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

### 6.2 Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Anwendung des RIDA®UNITY Norovirus I & II Tests benötigt:

Zubehör
RIDA®UNITY System; Artikelnummer: ZUNITY (R-Biopharm AG)
RIDA®UNITY-Verbrauchsmaterialien (Spitzen, Platten, Reaktionsgefäße, Folien) - Siehe hierzu Bedienungsanleitung RIDA®UNITY System Bestellinformationen Verbrauchsmaterial
Vortexer
Tischzentrifuge
Puderfreie Einmalhandschuhe
Externer Cycler (mögliche Systemerweiterung)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Das RIDA®UNITY Norovirus I & II Kit kann in Verbindung mit anderen kompatiblen Cyclern verwendet werden. Alternative real-time PCR-Geräte müssen durch den Anwender verifiziert/validiert werden. Kontaktieren Sie bitte die R-Biopharm AG zur Überprüfung der Kompatibilität unter [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

Für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von qualifiziertem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.

Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.

In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken. Vermeiden Sie eine Kontamination der Proben und der Komponenten des Kits mit Mikroben und Nukleasen (DNase / RNase).

Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.

Das Austauschen und Vermischen der Komponenten (Reaction Mix, Enzyme-Mix, Positive Control, Negative Control) einer Kit-Charge mit den Komponenten einer anderen Charge ist untersagt.

Das Testkit kann nach erstmaliger Öffnung bis zu 8 Wochen lang verwendet werden (ein erneutes Laden bis zu 6 mal ist hierbei möglich). Nach Erreichen des Verfallsdatums sollte das Testkit nicht mehr verwendet werden. Diese Vorgaben werden ebenfalls durch das RIDA<sup>®</sup>UNITY System überprüft.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details zum Safety Data Sheet (SDS) finden Sie unter der Artikelnummer auf <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Für Anwender in der Europäischen Union: Im Zusammenhang mit dem Produkt auftretende schwerwiegenden Vorfälle sind der R-Biopharm AG und der zuständigen nationalen Behörde zu melden.

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

Für die bestmögliche Performance des RIDA<sup>®</sup>UNITY Norovirus I & II Assay wird die Verwendung von frischem Probenmaterial empfohlen.

Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden.

Stuhlproben sollten nicht in Transportbehältern gesammelt werden, die Transportmedien mit Konservierungstoffen, tierischen Seren, Metall-Ionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien enthalten, da Interferenzen mit den RIDA<sup>®</sup>UNITY Tests auftreten können.

Es wird empfohlen, Aliquots der Proben herzustellen, um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Gefrorene Proben sollten direkt vor der Extraktion aufgetaut werden, um eine Degradation der Nukleinsäuren zu verhindern.

Bitte folgen Sie den Probenlagerungsvorgaben in Tabelle 3 bis 6.

**Tab. 3:** Probenlagerung - Nachweis Norovirus GGI

Native Proben - Stuhl		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 Tage	≤ 9 Tage	≤ 6 Monate

Im Eluat (aus Stuhl)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 Stunden	≤ 36 Stunden	≤ 1 Monat

Bei einer Lagerung von -20 °C / - 80 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen der Stuhlprobe bis zu 5 Mal die Testeigenschaft nicht.

Bei einer Lagerung von -20 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen des Eluates (aus Stuhl) bis zu 3 Mal die Testeigenschaft nicht.

**Tab. 4:** Probenlagerung - Nachweis Norovirus GGII

Native Proben - Stuhl		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 Tage	≤ 9 Tage	≤ 6 Monate

Im Eluat (aus Stuhl)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤24 Stunden	≤ 36 Stunden	≤ 1 Monat

Bei einer Lagerung von -20 °C / - 80 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen der Stuhlprobe bis zu 5 Mal die Testeigenschaft nicht.

Bei einer Lagerung von -20 °C beeinträchtigt ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen des Eluates (aus Stuhl) bis zu 3 Mal die Testeigenschaft nicht.

## 8.1 DNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA-Isolierung aus Stuhlproben kommt das RIDA®UNITY Universal Extraction Kit zur Anwendung. Die korrekte Durchführung in der Gebrauchsanweisung des RIDA®UNITY Universal Extraction Kit ist zu beachten (Kapitel: Nukleinsäure-Präparation aus Stuhlproben).

## 9. Testdurchführung

Sowohl die Proben als auch die Reagenzien des RIDA®UNITY Norovirus I & II werden zu Beginn der Anwendung bereits auf dem RIDA®UNITY System platziert. Vorab sollten **Reaction Mix**, **Negative Control** und **Positive Control** mittels eines Vortexers ausreichend gemischt werden. Den **Enzyme Mix** nicht vortexen! Im Anschluss sind alle Komponenten kurz zu zentrifugieren.

Die PCR-Tubes für die zu untersuchenden Proben müssen in dem integrierten PCR-Cycler vorab positioniert werden.

Für die korrekte Beladung des Systems mit Reagenzien und Verbrauchsmaterial stehen entsprechende Carrier zu Verfügung. Die Beladung erfolgt nach Angabe des RIDA®UNITY Systems. Entsprechende Abschnitte im Handbuch des RIDA®UNITY Systems sind zu beachten (Kapitel: Durchführung eines Laufs).

Der RIDA®UNITY Norovirus I & II Test darf nur in Kombination mit dem RIDA®UNITY Internal Control Kit angewendet werden. Dadurch kann eine mögliche PCR-Inhibition frühzeitig erkannt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt werden. Die Anwendung erfolgt entsprechend den Angaben in der Gebrauchsanweisung des RIDA®UNITY Internal Control Kits (Kapitel: Testdurchführung).

Die automatisierte Abarbeitung wird im Handbuch des RIDA®UNITY Systems beschrieben (Kapitel: Durchführung eines Laufs).

## 9.1 Geräteeinstellungen

### 9.1.1 Universal real-time PCR-Profil

Zur Harmonisierung der RIDA®UNITY Assays wird der RIDA®UNITY Norovirus I & II Assay ausschließlich im Universalprofil verifiziert. Das bietet die Möglichkeit DNA- und RNA-Assays miteinander zu kombinieren. Daher ist im Universalprofil generell eine reverse Transkription vorangestellt.

**Tab.7:** Universal real-time PCR Profil für RIDA®UNITY

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95°C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95°C
Annealing/Extension	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.**

**Tab.8:** Universal real-time PCR Profil für CFX96™ Dx

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95°C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95°C
Annealing/Extension	30 sec, 60°C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.**

## 9.2 Detektionskanaleinstellung

**Tab.9:** Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

<b>Real-time PCR-Gerät</b>	<b>Nachweis</b>	<b>Detektionskanal</b>	<b>Bemerkung</b>
<b>R-Biopharm RIDA®UNITY</b>	Norovirus GGII	FAM	SEEK Kanal GGII
	Internal Control	HEX	SEEK Kanal ICD
	Norovirus GGI	Cy5	SEEK Kanal GGI
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	Norovirus GGII	FAM	SEEK Kanal GGII
	Internal Control	VIC	SEEK Kanal ICD
	Norovirus GGI	Cy5	SEEK Kanal GGI

## 10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software RIDA®SEEK des RIDA®UNITY Systems. **Negative Control** und **Positive Control** müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 9).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

Die **Negative Control** beinhaltet bereits die RIDA®UNITY Internal Control. Da sie kein Template enthält, sind in den Target-Kanälen keine Signale zu erwarten. Positive Signale im IC-Kanal, mit dem die Internal Control detektiert wird, sind zwingend notwendig (s. Tab 10).

**Tab.10:** Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	Ergebnis	IC Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	+	N/A*	Siehe Certificate of Analysis
Negativkontrolle	-	Ct > 20	0

\*Der IC Kanal kann in der Positivkontrolle unter Umständen ein positives Signal zeigen und ist daher nicht zu bewerten.

Wenn die Positivkontrolle nicht in dem angegebenen Ct-Bereich liegt, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen in der PCR neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen in der PCR neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- korrekte Testdurchführung

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm-Distributor.

## 11. Auswertung und Interpretation

Die Auswertung und Interpretation der Proben erfolgt über die Analyse-Software des RIDA®UNITY Systems, der RIDA®SEEK.

Derzeit gibt es weder eine international anerkannte Referenzmethode noch ein Referenzmaterial für die Standardisierung. Die Kontrollmaterialien sind auf die R-Biopharm AG internen Standards, basierend aus spezifischen, synthetischen RNA-Amplifikaten, metrologisch rückführbar.

Für weitere Informationen zur metrologischen Rückführbarkeit kontaktieren Sie bitte die R-Biopharm AG.

Entnehmen Sie bitte die eingestellten Werte und Schwankungen sowie weitere Details dem Analysezertifikat (Certificate of Analysis, CoA).

**Tab.11:** Interpretation der Ergebnisse\*

Nachweis von			
Norovirus GGII	Norovirus GGI	IC	Ergebnis
+	-	+/-	<b>Norovirus GGII<sup>1</sup> nachweisbar</b>
-	+	+/-	<b>Norovirus GGI nachweisbar</b>
+	+	+/-	<b>Norovirus GGII<sup>1</sup> und Norovirus GGI nachweisbar</b>
-	-	+	<b>Zielgene sind nicht nachweisbar</b>
-	-	-	<b>Ungültig</b>

\* += positiv

- = negativ

<sup>1</sup> siehe Grenzen der Methoden (Punkt 10)

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-RNA und die **Internal Control** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control** jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der **Internal Control** ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der **Internal Control** führen können.

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control** jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion und der vorangestellten Extraktion kann durch die Detektion der **Internal Control** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben- RNA und die Internal Control keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf.

## 12. Grenzen der Methode

1. Der RIDA®UNITY Norovirus I & II Test weist RNA von Norovirus GGI und Norovirus GGII aus unbehandelten humanen Stuhlproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des ermittelten Ct-Werts und dem Auftreten schwerer klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem vollständigen klinischen Bild zu interpretieren.
2. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
3. Dieser Test ist nur zur automatischen Abarbeitung mit dem RIDA®UNITY System zugelassen.
4. Dieser Test wird nur für Stuhlproben verifiziert und validiert.
5. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
6. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
7. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro*-diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter der Nachweisgrenze (LoD 95 %) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
8. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®UNITY Norovirus I & II zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
9. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (Norovirus GGI und GGII (ORF1/ORF2 junction Region)) vorhanden sind.
10. Noroviren der Genogruppe IV, die in sehr seltenen Fällen auch Menschen infizieren können, werden ebenfalls mit RIDA®UNITY Norovirus I & II nachgewiesen.
11. Dieser Assay sollte gemäß der GLP-Verordnung (Gute Laborpraxis) durchgeführt werden. Der Anwender muss bei der Durchführung des Tests die Anweisungen des Herstellers genau befolgen.

## 13. Leistungsmerkmale

### 13.1 Klinische Leistungsmerkmale

Die RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time PCR wurde in einem externen Labor mit einem CE-markierten Referenztest anhand von 237 Stuhlproben, von Patienten mit Symptomen einer gastrointestinalen Infektion, verglichen.

Die Ergebnisse zeigen eine hohe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von Norovirus GGI oder GGII aus humanen Stuhlproben.

**Tab. 12:** Nachweis von Norovirus GGI

		Referenz PCR		Gesamt
		Positiv	Negativ	
RIDA®UNITY Norovirus I & II – Norovirus GGI	Positiv	33	0	33
	Negativ	3	201	204
	Gesamt	36	201	237

Relative Sensitivität (95 % KI)	91,7 % (77,5 % – 98,2 %)
Relative Spezifität (95 % KI)	100 % (98,2 % – 100 %)

**Tab. 13:** Nachweis von Norovirus GGII

		Referenz PCR		Gesamt
		Positiv	Negativ	
RIDA®UNITY Norovirus I & II – Norovirus GGII	Positiv	126	0	126
	Negativ	4	107	111
	Gesamt	130	107	237

Relative Sensitivität (95 % KI)	96,9 % (92,3 % – 99,2 %)
Relative Spezifität (95 % KI)	100 % (96,6 % – 100 %)

## 13.2 Analytische Leistungsmerkmale

### 13.2.1 Nachweisgrenze (LoD 95 %)

Zur Ermittlung des LoDs wurde pro Target jeweils eine positive Probe (negativer Stuhlpool gespiked mit positiven klinischen Stuhlproben) in fünf Verdünnungsstufen (in 0,25 log-Stufen) mit 20 Replikaten pro Stufe mit einer Lot gemessen.

Darauffolgend wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Anschließend wurde die Bestätigung des berechneten LoD mit 20 Replikaten pro Target an der berechneten Verdünnungsstufe / Konzentration durchgeführt.

Für den Nachweis von Norovirus GGI und Norovirus GGII RNA mithilfe des RIDA®UNITY Norovirus I & II Assays auf dem UNITY System konnten folgende Nachweisgrenzen („Limit of detection“, LoD) bestimmt werden.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 15 dargestellt.

**Tab. 15:** Ergebnisse der Nachweisgrenze des RIDA®UNITY Norovirus I & II Tests für die Parameter Norovirus GGI und Norovirus GGII in Stuhlproben.

	Norovirus GGI	Norovirus GGII
LoD	4,85E-04 [Verdünnungsfaktor]**	5,98E-05 [Verdünnungsfaktor]*

(\*) Relative Verdünnung der Stammkonzentration. Klinische positive Probe mit Ct-Bereich 26-27

(\*\*) Relative Verdünnung der Stammkonzentration. Klinische positive Probe mit Ct-Bereich 30-31

Der LoD für den Parameter Norovirus GGI in Stuhlproben wurde bei 4,85E-04 [Verdünnungsfaktor] bestimmt.

Der LoD für den Parameter Norovirus GGII in Stuhlproben wurde bei 5,98E-05 [Verdünnungsfaktor] bestimmt.

Für den erweiterten Workflow mit dem CFX96™ Dx konnten diese LoD Werte bestätigt werden unter der Voraussetzung, dass wir in einem 2-3-fachen LoD Bereich verbleiben.

## 13.2.2 Analytische Spezifität

### Interferierende Substanzen

Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren und interferierenden Substanzen kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen. Daher wurden die Auswirkungen verschiedener Substanzen, die aufgrund verbreiteter Anwendung bei gastrointestinalen Infektionen oder verbreitetem Vorkommen in den entsprechenden Proben vorliegen könnten, untersucht.

Substanzen, die möglicherweise die Testergebnisse signifikant beeinflussen könnten, wurden zunächst mit hohen Konzentrationen (dreifache Tagesdosis oder Simulation des „worst case“) in einem Interferenz-Screen untersucht.

Für die in Tabelle 16 aufgeführten Substanzen wurden keine Interferenzen festgestellt.

**Tab. 16:** Potentiell interferierende Substanzen

Potentiell interferierende Substanz	Konzentration
Ciprofloxacin-ratiopharm® 500mg Filmtabletten (Ciprofloxacin)	0,375 % [w/v]
Ethanol	5 % bezogen auf das Eluat
Guanidiniumhydrochlorid	5 % bezogen auf das Eluat
Humanblut	5 % [v/v]
Mucine	5 % [w/v]
Stearin/Palmitinsäure	40 % [w/v]

## Kreuzreaktivität

Verschiedene Organismen (Bakterien, Pilze und Viren), die häufig in der Matrix Stuhl vorkommen können, wurden untersucht. Die Auswahl der zu untersuchenden Mikroorganismen für diesen Assay beruhte entweder darauf, dass diese natürlicherweise in Stuhlproben zu finden sind oder als gastrointestinale Erreger entsprechende Symptome hervorrufen. Für Analysen wurden Bakterien- (zwischen  $10^7$  und  $10^9$  CFU/ml) und Pilzkulturen oder Virusisolate (aus positiven Stuhlproben) der jeweiligen Organismen verwendet.

Die RIDA<sup>®</sup>UNITY Norovirus I & II multiplex real-time PCR ist spezifisch für Norovirus GGI und Norovirus GGII. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 17):

**Tab. 17:** Potentiell kreuzreaktive Organismen.

Organismus	Testergebnis*	
	Norovirus GGI	Norovirus GGII
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> (Serovar Enteritidis)	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (Serovar 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 Präzision

Die Präzision des RIDA®UNITY Norovirus I & II real-time PCR Tests wurde für folgende Betrachtungsebenen ermittelt.

*Intra-Assay* Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben mit je 20 Replikaten auf dem RIDA®UNITY unter identischen Bedingungen.

*Inter-Assay* Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben in 20 Läufen in Duplikaten an 10 Arbeitstagen (2 Läufe pro Tag) auf unterschiedlichen Geräten unter reproduzierbaren Bedingungen.

Die Testungen zur *Intra-* und *Inter-Assay* Präzision erfolgten mit drei unterschiedlichen Lots.

Die erhaltenen Variationskoeffizienten der jeweiligen Messungen mit dem RIDA®UNITY Norovirus I & II real-time PCR Test lagen auf dem RIDA®UNITY bei max. 4,82 % und dem CFX96™ Dx bei max. 3,25 %.

**Tab. 18:** Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY Norovirus I & II Tests für Norovirus GGI (RIDA®UNITY System).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	25,6	24,1	24,3	30,5	29,6	29,4	29,8
	VK (%)	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
	VK (%)	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
	VK (%)	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
	VK (%)	1,50	1,30	0,93	3,17	2,34	2,75	3,35
5	Ct	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
	VK (%)	/	/	/	/	/	/	/

**Tab. 19:** Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY RIDA®UNITY Norovirus I & II Tests für Norovirus GGI (CFX96™ Dx).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	26,7	26,1	25,4	29,6	29,0	28,7	29,1
	VK (%)	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
	VK (%)	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
	VK (%)	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
	VK (%)	1,16	0,74	0,64	2,83	1,95	1,98	2,72
5	Ct	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
	VK (%)	/	/	/	/	/	/	/

**Tab. 20:** Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY Norovirus I & II Tests für Norovirus GGII (RIDA®UNITY System).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	23,4	21,7	21,7	28,4	26,9	26,8	27,4
	VK (%)	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
	VK (%)	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
	VK (%)	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
	VK (%)	1,45	1,31	0,96	4,30	2,86	3,34	4,82
5	Ct	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
	VK (%)	/	/	/	/	/	/	/

**Tab. 21:** Ergebnisse der Präzision des RIDA®UNITY Norovirus I & II Tests für Norovirus GGII (CFX96™ Dx).

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	24,2	23,4	22,7	27,7	27,2	26,8	27,2
	VK (%)	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
	VK (%)	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
	VK (%)	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
	VK (%)	1,11	0,69	0,85	3,25	2,27	2,23	3,03
5	Ct	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
	VK (%)	/	/	/	/	/	/	/

### 13.2.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time RT-PCR Tests wurde an einem definierten Panel an verschiedenen Norovirus Genotypen der Genogruppe GGI, GGII untersucht (s. Tab. 22).

**Tab. 22:** Analytische Reaktivitätstestung

Stamm	Ergebnis*	
	Norovirus GGII	Norovirus GGI
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	-	+

\* + = positiv (mindestens 2 von 3 Replikaten positiv)

- = negativ

## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2022-08-09	Freigabeversion

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

### Testspezifische Symbole

	Reaktions-Mix
	Enzyme-Mix
	Negativkontrolle
	Positivkontrolle

## 16. Literatur

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).