

RIDA® UNITY Norovirus I & II

REF UN1415



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

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



1. Uso previsto

Para el uso diagnóstico *in vitro*. La prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II, realizada en la plataforma RIDA®UNITY, es una RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación del ARN de norovirus de los genogrupos I (GI) y II (GII) en muestras de heces humanas no tratadas de personas con signos y síntomas de gastroenteritis aguda.

La prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II está prevista para asistir en el diagnóstico diferencial de infecciones por norovirus de los genogrupos I (GI) y II (GII) en pacientes con síntomas de gastroenteritis junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por norovirus y no deberían usarse como la única base para el diagnóstico.

El producto está destinado a un uso profesional.

2. Resumen y descripción del ensayo

Los norovirus son una de las causas más comunes de gastroenteritis no bacteriana en personas de todos los grupos de edad y provocan entre 70 000 y 200 000 muertes al año⁽¹⁾. Son responsables de alrededor del 20 % de todos los casos de gastroenteritis aguda en el mundo. Los norovirus humanos, antes llamados virus Norwalk, se identificaron por primera vez en 1972 en muestras de heces recolectadas durante un brote de gastroenteritis en Norwalk, Ohio, EE. UU., lo que los convirtió en los primeros patógenos comprobados como causantes de gastroenteritis.⁽²⁾

Los norovirus pertenecen a la familia *Caliciviridae* y son virus pequeños sin envoltura con ARN monocatenario (ARNmc). Basándose en las secuencias genéticas de la ARN polimerasa dependiente del ARN viral y de la proteína de la cápside, los norovirus se dividen en 10 genogrupos (de GI a GX) con más de 49 genotipos diferentes en la actualidad (9 × GI, 27 × GII, 3 × GIII, 2 × GIV, 2 × GV, 2 × GVI y 1 genotipo para GVII, GVIII, GIX [antes GII.15] y GX) y una variedad de cepas. Los genogrupos I, II y a veces IV son los más importantes en términos de patogenicidad humana⁽¹⁾. En Estados Unidos, más del 99 % de todos los brotes de norovirus están causados por los virus GI y GII⁽³⁾. La gastroenteritis debida a los norovirus suele estar causada por la presencia de viriones en las heces y los vómitos, mientras que solo hacen falta 10 partículas infecciosas para provocar la enfermedad. La gran estabilidad ambiental y la baja dosis de infección hacen que la transmisibilidad de los norovirus sea alta⁽⁴⁾. Los síntomas típicos de las infecciones por norovirus son diarrea, vómitos y náuseas⁽³⁾.

3. Principio del ensayo

La prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time RT-PCR es un ensayo de PCR de diagnóstico molecular para la diferenciación y la detección cualitativa directa de ARN de norovirus de los genogrupos I (GI), II (GII) y GIV en muestras de heces humanas. El procesamiento está totalmente automatizado con el sistema RIDA®UNITY. En primer lugar, se extraen los ácidos nucleicos utilizando el RIDA®UNITY Universal Extraction Kit y el Internal Control Kit. La secuencia diana se detecta en un formato de RT-PCR en tiempo real en un paso, donde la transcripción inversa (RT) y la posterior PCR se realizan en un vial de reacción. Durante el proceso, el ARN aislado se transcribe a ADNc mediante transcriptasa inversa. Los fragmentos génicos específicos de norovirus GI y GII/GIV se amplifican entonces utilizando PCR en tiempo real.

Las secuencias diana amplificadas (región de unión ORF1/ORF2) se detectan mediante sondas de hidrólisis etiquetadas con el extintor de fluorescencia en un extremo y un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la Taq polimerase separa al indicador del extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta con la cantidad de amplicones formados. El RIDA®UNITY Internal Control Kit debe utilizarse al mismo tiempo para poder comprobar la preparación de las muestras o la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones.*

Tabla 1: Reactivos suministrados

REF	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
UNZ1415RM	Reaction Mix	1 ×	1935 µL	amarillo, listo para usar
UNZ1415EM	Enzyme Mix	1 ×	350 µL	rojo, listo para usar
UNZ1415PC	Positive Control	1 ×	200 µL	azul, listo para usar
UNZ1415NC	Negative Control	1 ×	450 µL	blanco, listo para usar

* Con el uso repetido y en series más pequeñas, el número de reacciones puede reducirse.

5. Instrucciones de almacenamiento

- Siga las directrices de manipulación de la tabla 2 y almacene el kit directamente después de su uso, de acuerdo con la información especificada.
- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz, a una temperatura de entre -16 y -28 °C, y, en caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. La garantía de calidad deja de ser válida después de la fecha de caducidad.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (por ejemplo, en un refrigerador a 2 - 8 °C).
- La congelación y descongelación repetida hasta 8 veces no afecta a las propiedades de la prueba.

Tabla 2: Condiciones de almacenamiento e información

	Temperatura de conservación	Tiempo máximo de almacenamiento
sin abrir	-16 - -28 °C	Puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada.
abierto	-16 - -28 °C	8 ciclos de congelación y descongelación

6. Reactivos necesarios no suministrados

La prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real time RT-PCR está pensada exclusivamente para su uso con el sistema RIDA®UNITY. Los siguientes productos son absolutamente necesarios para un uso correcto del kit:

6.1 Reactivos

Los reactivos siguientes se necesitan para realizar la prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II:

Reactivos	Número de artículo
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Equipo de laboratorio

El siguiente equipo se necesita para realizar la prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II:

Equipo
Sistema RIDA®UNITY; referencia: ZUNITY (R-Biopharm AG)
Consumibles RIDA®UNITY (puntas, placas, viales de reacción, películas). Consulte las instrucciones de uso del sistema RIDA®UNITY, información sobre pedidos de consumibles.
Mezclador vórtex
Centrífuga de sobremesa
Guantes desechables sin talco
Termociclador externo (posible mejora del sistema)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

El kit RIDA®UNITY Norovirus I & II puede utilizarse junto con otros termocicladores compatibles. El usuario debe verificar/validar los equipos alternativos de PCR en tiempo real. Póngase en contacto con R-Biopharm AG en pcr@r-biopharm.de para comprobar la compatibilidad.

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Para el uso diagnóstico *in vitro*.

Esta prueba solo debe llevarla a cabo personal de laboratorio cualificado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.

Siga siempre las instrucciones de uso al llevar a cabo esta prueba.

No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.

Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.

No fume, ni coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.

Evite contaminar las muestras y los componentes del kit con microbios y nucleasas (DNasa/RNasa).

Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.

No intercambie ni mezcle los componentes (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) de un lote de un kit con los componentes de otro lote.

El kit de ensayo puede utilizarse durante 8 semanas después de su primera apertura (el kit puede recargarse hasta 6 veces). No utilice el kit de ensayo después de la fecha de caducidad. Estas especificaciones también son comprobadas por el sistema RIDA®UNITY.

Los usuarios son responsables de desechar de manera correcta todos los reactivos y materiales una vez utilizados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Encontrará más detalles sobre la hoja de datos de seguridad (Safety Data Sheet, SDS) con el número de artículo en <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para los usuarios de la Unión Europea: notificar todos los efectos adversos graves asociados al producto a R-Biopharm AG y a las autoridades nacionales competentes.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Se recomienda utilizar material de muestra fresco para lograr el mejor rendimiento posible del ensayo RIDA[®]UNITY Norovirus I & II.

Evite congelar y descongelar repetidamente la muestra.

No recoja las muestras de heces en recipientes de transporte que contengan medios con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes, porque estas sustancias pueden interferir con las pruebas RIDA[®]UNITY.

Se recomienda preparar alícuotas de las muestras para evitar la descongelación y congelación repetidas. Las muestras congeladas deben descongelarse inmediatamente antes de la extracción para evitar la degradación de los ácidos nucleicos.

Siga las instrucciones de almacenamiento de muestras de las tablas 3 y 6.

Tabla 3: Almacenamiento de muestras - detección de norovirus GI

Muestras nativas, heces		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 / -80 °C
≤ 7 días	≤ 9 días	≤ 6 meses

En el eluato (de las heces)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 1 meses

A una temperatura de almacenamiento de -20 / -80 °C, la congelación/descongelación repetida de la muestra de heces hasta 5 veces no afecta a las propiedades de la prueba.

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C, la congelación/descongelación repetida del eluato (de heces) hasta 3 veces no afecta las propiedades de la prueba.

Tabla 4: Almacenamiento de muestras - detección de norovirus GII

Muestras nativas, heces		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 / -80 °C
≤ 7 días	≤ 9 días	≤ 6 meses

En el eluato (de las heces)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 1 meses

A una temperatura de almacenamiento de -20 / -80 °C, la congelación/descongelación repetida de la muestra de heces hasta 5 veces no afecta a las propiedades de la prueba.

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C, la congelación/descongelación repetida del eluato (de heces) hasta 3 veces no afecta las propiedades de la prueba.

8.1 Preparación del ADN a partir de muestras de heces

Para aislar el ADN de las muestras de heces, utilice el RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Siga los procedimientos correctos en las instrucciones de uso del RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (Sección: Preparación de ácido nucleico a partir de muestras de heces).

9. Ejecución de la prueba

Tanto las muestras como los reactivos del kit RIDA®UNITY Norovirus I & II se colocan en el sistema RIDA®UNITY al inicio de su uso.

Previamente, mezcle de manera apropiada la **Reaction Mix**, el **Negative Control** y el **Positive Control** utilizando un mezclador vórtex. No agite en un mezclador vórtex la **Enzyme Mix**. Después, centrifugue brevemente todos los componentes.

Los tubos de PCR para las muestras a examinar deben colocarse previamente en el termociclador de PCR integrado.

Existen soportes para cargar correctamente el sistema con reactivos y consumibles. Para el proceso de carga, siga las instrucciones del sistema RIDA®UNITY. Observe las secciones correspondientes del manual del sistema RIDA®UNITY (Sección: Realización de un análisis).

La prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II solo puede utilizarse en combinación con el RIDA®UNITY Internal Control Kit. Esto permite el reconocimiento temprano de la inhibición potencial de la PCR, la verificación de la integridad de los reactivos y la confirmación de la extracción exitosa de ácidos nucleicos. El procedimiento se describe en las instrucciones de uso del RIDA®UNITY Internal Control Kit (Sección: Realización de la prueba).

El procesamiento automatizado se describe en el manual del sistema RIDA®UNITY (Sección: Realización de un análisis).

9.1 Configuración del dispositivo

9.1.1 Perfil universal por PCR en tiempo real

Para armonizar los ensayos RIDA®UNITY, el ensayo RIDA®UNITY Norovirus I & II se verificó exclusivamente en el perfil universal. Esto permite combinar los ensayos de ADN y ARN entre sí. En términos generales, la transcripción inversa es lo primero en el perfil universal.

Tabla 7: Perfil universal por PCR en tiempo real para RIDA®UNITY

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Tiempo de almacenamiento

Nota: La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

Tabla 8: Perfil universal por PCR en tiempo real en el CFX96™ Dx

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Tiempo de almacenamiento

Nota: La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

9.2 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
R-Biopharm RIDA®UNITY	Norovirus GII	FAM	Canal SEEK GGII
	Control interno	HEX	Canal SEEK ICD
	Norovirus GI	Cy5	Canal SEEK GGI
Bio-Rad CFX96™ Dx	Norovirus GII	FAM	Canal SEEK GGII
	Control interno	VIC	Canal SEEK ICD
	Norovirus GI	Cy5	Canal SEEK GGI

10. Control de calidad: indicación de inestabilidad o caducidad de los reactivos

Las muestras se evalúan con el software analítico RIDA®SEEK del sistema RIDA®UNITY. El **Negative Control** y el **Positive Control** deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 9).

El **Positive Control** está presente en una concentración de 10^3 copias/ μ L. Se usa en una cantidad total de 5×10^3 copias en cada corrida de PCR.

El **Negative Control** ya contiene el control interno RIDA®UNITY. Como los controles no contienen una plantilla, no hay que prever ninguna señal en los canales de destino. Las señales positivas en el canal IC con el que se detecta el control interno son esenciales (consulte la tabla 10).

Tabla 10: Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado	IC Ct	Ct de genes diana
Control positivo	+	N/A*	Ver el certificado de análisis (Certificate of Analysis, CoA)
Control negativo	-	Ct > 20	0

*En determinadas circunstancias, el canal IC puede tener una señal positiva en el control positivo y, por tanto, no debe evaluarse.

Si el control positivo no se detecta en el intervalo de Ct especificado pero el control negativo es válido, es necesario volver a analizar en la PCR todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, es necesario volver a analizar todas las reacciones, incluidos los controles.

Si los valores especificados no se cumplen, compruebe lo siguiente antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados
- Ejecución de la prueba correcta

Si las condiciones tampoco se cumplen después de repetir el ensayo, consulte al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

La evaluación y la interpretación de las muestras se realizan mediante el software analítico del sistema RIDA®UNITY, RIDA®SEEK.

Actualmente no existe ningún método de referencia o material de referencia reconocido internacionalmente para la normalización. Los materiales de control son metrologicamente trazables a los estándares internos de R-Biopharm AG basados en amplicones específicos sintéticos de ARN.

Para obtener más información sobre la trazabilidad metroológica, póngase en contacto con R-Biopharm AG.

Los valores especificados, los rangos y otros detalles se encuentran en el certificado de análisis (Certificate of Analysis, CoA).

Tabla 11: Interpretación de los resultados*

Detección de			
Norovirus GII	Norovirus GI	IC	Resultado
+	-	+/-	Norovirus GII ¹ detectable
-	+	+/-	Norovirus GI detectable
+	+	+/-	Norovirus GII ¹ y norovirus GI detectables
-	-	+	Genes diana no detectables
-	-	-	No válido

*+ = positivo

- = negativo

¹ Ver Limitaciones del método (sección 10)

Una muestra es positiva si el ARN de la muestra y el **Internal Control** presentan señal de amplificación en el sistema de detección.

Una muestra también es positiva si el ARN de la muestra presenta señal de amplificación pero no se observa ninguna señal de amplificación para el **Internal Control** en el sistema de detección. La detección del **Internal Control** no es necesaria en este caso debido a que las concentraciones altas de amplicón pueden dar lugar a una señal débil o ausente del **Internal Control**.

Una muestra es negativa si el ARN de la muestra no presenta señal de amplificación pero se observa una señal de amplificación para el **Internal Control** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR y la extracción previa se pueden excluir por la detección del **Internal Control**.

Una muestra no es válida si el ARN de la muestra y el Internal Control no muestran una señal de amplificación en el sistema de detección. Hay inhibidores en la muestra o se produjo un error durante el proceso de extracción.

12. Limitaciones del método

1. La prueba RIDA[®]UNITY Norovirus I & II detecta el ARN de los norovirus GI y GII de muestras de heces humanas sin tratar. Este ensayo no permite derivar una conexión entre el valor Ct determinado y la ocurrencia de síntomas clínicos graves. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con los síntomas clínicos completos.
2. El diagnóstico no debe basarse únicamente en el resultado del ensayo de biología molecular, sino que siempre deben tenerse en cuenta la historia clínica y los síntomas del paciente.
3. Esta prueba está aprobada únicamente para el procesamiento automático mediante el sistema RIDA[®]UNITY.
4. Esta prueba solo está verificada y validada para muestras de heces.
5. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de las muestras, o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica, pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
6. La presencia de inhibidores de PCR puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos.
7. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse una concentración sumamente baja de las secuencias diana, por debajo del límite de detección (LoD 95 %). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
8. Las mutaciones o polimorfismos en los sitios de unión de la sonda o el cebador pueden interferir con la detección de variantes nuevas o desconocidas y pueden dar lugar a resultados negativos falsos al usar la prueba RIDA[®]UNITY Norovirus I & II.
9. Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Un resultado positivo indica que los genes diana (norovirus GI y GII, región de unión ORF1/ORF2) están presentes.
10. Los norovirus del genogrupo IV, que, en casos muy raros, también pueden infectar a los seres humanos, también se detectan con RIDA[®]UNITY Norovirus I & II.
11. Este ensayo debe realizarse de conformidad con la normativa de las buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los usuarios deben seguir atentamente las instrucciones del fabricante al realizar la prueba.

13. Características de rendimiento

13.1 Características de rendimiento clínico

La prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time PCR se comparó en un laboratorio externo con una prueba de referencia con marca CE basada en 237 muestras de heces de pacientes con síntomas de infección gastrointestinal.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para la detección de norovirus GI o GII en muestras de heces humanas.

Tabla 12: Detección de norovirus GI

		PCR de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY Norovirus I & II - Norovirus GI	Positivo	33	0	33
	Negativo	3	201	204
	Total	36	201	237

Sensibilidad relativa (IC 95 %)	91,7 % (77,5 % - 98,2 %)
Especificidad relativa (IC 95 %)	100 % (98,2 % - 100 %)

Tabla 13: Detección de norovirus GII

		PCR de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY Norovirus I & II - Norovirus GII	Positivo	126	0	126
	Negativo	4	107	111
	Total	130	107	237

Sensibilidad relativa (IC 95 %)	96,9 % (92,3 % - 99,2 %)
Especificidad relativa (IC 95 %)	100 % (96,6 % - 100 %)

13.2 Características de rendimiento analíticas

13.2.1 Límite de detección (LoD 95 %)

Se midió una muestra positiva (combinado de muestras negativas, enriquecidas con muestras de heces clínicas positivas) en cinco pasos de dilución (en pasos de 0,25 log) para cada objetivo con 20 réplicas por paso en un lote para determinar el LoD. A continuación, se realizó un análisis probit. A continuación, se confirmó el LoD calculado con 20 réplicas por objetivo para el paso de dilución/concentración calculado.

Para la detección de ARN de norovirus GI y norovirus GII utilizando los ensayos RIDA®UNITY Norovirus I & II en el Sistema UNITY, se identificaron los siguientes límites de detección (LoD).

Los resultados de las mediciones se muestran en la tabla 15.

Tabla 15: Resultados del límite de detección de la prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II para los parámetros norovirus GI y norovirus GII en muestras de heces.

	Norovirus GI	Norovirus GII
LoD	4,85E-04 [factor de dilución]**	5,98E-05 [factor de dilución]*

(*) Dilución relativa de la concentración de la solución madre. Muestra clínica positiva con intervalo de Ct de 26 - 27

(**) Dilución relativa de la concentración de la solución madre. Muestra clínica positiva con intervalo de Ct de 30 - 31

El LoD para el parámetro norovirus GI en muestras de heces se determinó en 4,85E-04 [factor de dilución].

El LoD para el parámetro norovirus GII en muestras de heces se determinó en 5,98E-05 [factor de dilución].

Para el flujo de trabajo mejorado utilizando el CFX96™ Dx, estos valores de LoD se confirmaron bajo el supuesto de que nos mantenemos en un rango de LoD de 2-3 veces.

13.2.2 Especificidad analítica

Sustancias interferentes

La presencia de inhibidores de PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos. Por lo tanto, se investigaron los efectos de diversas sustancias que pueden existir dado su uso generalizado para las infecciones gastrointestinales o la ocurrencia generalizada en las muestras correspondientes.

Las sustancias que podrían influir significativamente en los resultados de las pruebas se examinaron inicialmente a altas concentraciones (el triple de la dosis diaria o la simulación del peor caso) en un cribado de interferencia.

No se identificó interferencia para las sustancias enumeradas en la tabla 16.

Tabla 16: Sustancias potencialmente interferentes

Sustancia potencialmente interferente	Concentración
Ciprofloxacina-ratiopharm® 500 mg tabletas recubiertas con película (ciprofloxacino)	0,375 % [p/v]
Etanol	5 % basado en el eluato
Clorhidrato de guanidinio	5 % basado en el eluato
Sangre humana	5 % [v/v]
Mucinas	5 % [p/v]
Ácido esteárico/palmítico	40 % [p/v]

Reacciones cruzadas

Se investigaron diversos organismos (bacterias, parásitos y virus) que pueden encontrarse en la matriz de las heces. Los microorganismos a investigar para este ensayo se eligieron porque, o bien están presentes de forma natural en las muestras de heces, o bien causan los síntomas correspondientes como patógenos gastrointestinales. Para los análisis se utilizaron cultivos bacterianos (entre 10^7 y 10^9 CFU/mL) y cultivos fúngicos o aislados virales (a partir de muestras de heces) de los respectivos organismos.

La prueba RIDA[®]UNITY Norovirus I & II multiplex real-time RT-PCR es específica para norovirus GI y norovirus GII. No se detectó reactividad cruzada con las siguientes especies (consulte la tabla 17):

Tabla 17: Microorganismos con posible reactividad cruzada.

Microorganismo	Resultados de la prueba*	
	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> (serotipo Enteritidis)	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (serotipo 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 Precisión

Se determinó la precisión de la prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II real-time PCR para los siguientes niveles de consideración.

Precisión intraensayo: determinación de 5 muestras de control con 20 réplicas cada una en el RIDA®UNITY en condiciones idénticas.

Precisión interensayo: Determinación de 5 muestras de control en 20 corridas por duplicado en 10 días de trabajo (2 corridas por día) realizadas en instrumentos diferentes en condiciones reproducibles.

las pruebas de precisión intra e interensayo se llevaron a cabo con tres lotes diferentes.

Los coeficientes de variación obtenidos de las respectivas mediciones realizadas con la prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II real-time PCR no superaron el 4,82 % en el RIDA®UNITY y el 3,25 % en el CFX96™ Dx.

Tabla 18: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II para norovirus GI (sistema RIDA®UNITY).

Valor medio de Ct/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote	
	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit	
1	Ct	25,6	24,1	24,3	30,5	29,6	29,4	29,8
	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
	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
	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
	CV (%)	1,50	1,30	0,93	3,17	2,34	2,75	3,35
5	Ct	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

Tabla 19: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II para norovirus GI (CFX96™ Dx).

Valor medio de Ct/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote	
	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit	
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	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

Tabla 20: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II para norovirus GII (sistema RIDA®UNITY).

Valor medio de Ct/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote	
	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit	
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	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

Tabla 21: Resultados de la precisión de la prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II para norovirus GII (CFX96™ Dx).

Valor medio de Ct/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote	
	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit	
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	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

13.2.4 Reactividad analítica

La reactividad de la prueba RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time RT-PCR se evaluó en un panel definido de diversos genotipos de norovirus de los genogrupos I y II (consulte la tabla 22).

Tabla 22: Pruebas de reactividad analítica

Cepa	Resultado*	
	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	-	+

*+ = positivo (al menos 2 de 3 réplicas positivas)

- = negativo

14. Historial de versiones

Número de versión	Sección y designación
2022-08-09	Versión de lanzamiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Siga las instrucciones de uso
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de conservación
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

	Mezcla de reacción
	Mezcla enzimática
	Control negativo
	Control positivo

16. Bibliografía

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).