

RIDA® UNITY Norovirus I & II

REF UN1415



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

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



1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. Il test RIDA®UNITY Norovirus I & II, eseguito sulla piattaforma RIDA®UNITY, è una RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dell'RNA dei norovirus dei genogruppi I (GI) e II (GII) in campioni fecali umani non trattati di soggetti con segni e sintomi di gastroenterite acuta.

Il test RIDA®UNITY Norovirus I & II è concepito per supportare la diagnosi differenziale delle infezioni da norovirus dei genogruppi I (GI) e II (GII) in pazienti con sintomi di gastroenterite in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono un'infezione da norovirus e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi.

Il prodotto è destinato all'uso professionale.

2. Sintesi e spiegazione del test

I norovirus sono una delle cause più comuni al mondo di gastroenterite non batterica, in persone di tutti i gruppi di età, e provocano da circa 70.000 a 200.000 morti ogni anno.⁽¹⁾ Sono responsabili di circa il 20% di tutti i casi di gastroenterite acuta nel mondo. I norovirus umani, precedentemente noti come virus di Norwalk, sono stati identificati per la prima volta nel 1972 in campioni di feci raccolti durante un'epidemia di gastroenterite a Norwalk (Ohio, USA), diventando così i primi patogeni virali di cui è stata dimostrata la capacità di causare gastroenteriti.⁽²⁾

I norovirus appartengono alla famiglia *Caliciviridae* e sono piccoli virus senza involucro con RNA a filamento singolo (ssRNA). Sulla base delle sequenze genetiche dell'RNA polimerasi dipendente da RNA virale e della proteina del capsido, i norovirus sono suddivisi in 10 genogruppi (da GI a GX) con attualmente più di 49 genotipi diversi (9 × GI, 27 × GII, 3 × GIII, 2 × GIV, 2 × GV, 2 × GVI e 1 genotipo ciascuno per GVII, GVIII, GIX [precedentemente GII.15] e GX) e svariati ceppi. I genogruppi I, II e talvolta IV sono i più importanti in termini di patogenicità umana.⁽¹⁾ Negli Stati Uniti, più del 99% di tutte le epidemie di norovirus sono causate da virus GI e GII.⁽³⁾ La gastroenterite dovuta ai norovirus è spesso causata dalla presenza di virioni nelle feci e nel vomito, mentre bastano 10 particelle infettive per causare la malattia. L'alta stabilità ambientale e la bassa dose di infezione rendono il norovirus altamente trasmissibile.⁽⁴⁾ I sintomi tipici delle infezioni da norovirus sono diarrea, vomito e nausea.⁽³⁾

3. Principio del test

Il test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®UNITY Norovirus I & II è una PCR diagnostica molecolare per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione di RNA di norovirus del genogruppo I (GI) e RNA di norovirus del genogruppo II (GII) e GIV in campioni di feci umane. La processazione è completamente automatizzata con il sistema RIDA®UNITY. In primo luogo, gli acidi nucleici vengono estratti utilizzando il RIDA®UNITY Universal Extraction Kit e l'Internal Control Kit. La sequenza target viene rivelata mediante RT-PCR real-time in una singola fase: la trascrizione inversa (RT) e la successiva PCR sono eseguite nella medesima cuvetta di reazione. Nel processo, l'RNA isolato viene trascritto in cDNA con l'ausilio di una trascrittasi inversa. I frammenti genici specifici dei norovirus GI e GII/GIV vengono successivamente amplificati mediante PCR real-time.

Le sequenze target amplificate (regione della giunzione ORF1/ORF2) vengono rivelate utilizzando sonde a idrolisi etichettate con il quencher a un'estremità e un colorante reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. In presenza di una sequenza target, le sonde ibridano con l'amplicone. Durante l'estensione, la Taq Polymerase separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica di uno strumento di PCR real-time. Il segnale fluorescente aumenta con la quantità di ampliconi formati.

Contemporaneamente, deve essere utilizzato il RIDA®UNITY Internal Control Kit per poter verificare la preparazione del campione e/o la potenziale inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

I reagenti nel kit sono sufficienti per 96 determinazioni.*

Tabella 1: Contenuto della confezione

| RIF | Reagente | Quantità | | Colore del tappo |
|-----------|------------------|----------|---------|--------------------------|
| UNZ1415RM | Reaction Mix | 1 × | 1935 µL | giallo, pronto per l'uso |
| UNZ1415EM | Enzyme Mix | 1 × | 350 µL | rosso, pronto per l'uso |
| UNZ1415PC | Positive Control | 1 × | 200 µL | blu, pronto per l'uso |
| UNZ1415NC | Negative Control | 1 × | 450 µL | bianco, pronto per l'uso |

* Con un utilizzo ripetuto e in serie più piccole, il numero di reazioni può ridursi.

5. Istruzioni di conservazione

- Seguire le linee guida per la manipolazione contenute nella Tabella 2 e riporre il kit immediatamente dopo l'uso attenendosi alle informazioni specificate.
- I reagenti devono essere conservati lontano dalla luce, a una temperatura compresa fra -16 e -28 °C e prima dell'apertura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. La garanzia di qualità non è più valida dopo la data di scadenza.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati con cura prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2-8 °C).
- Cicli di congelamento e scongelamento ripetuti fino a 8 volte non influenzano le proprietà del test.

Tabella 2: Condizioni di conservazione e informazioni

| | Temperatura di conservazione | Tempo massimo di conservazione |
|---------------------|-------------------------------------|--|
| prima dell'apertura | da -16 a -28 °C | Utilizzabile fino alla data di scadenza indicata |
| dopo l'apertura | da -16 a -28 °C | 8 cicli di congelamento e scongelamento |

6. Reagenti necessari ma non forniti

Il test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®UNITY Norovirus I & II è destinato esclusivamente all'uso con il sistema RIDA®UNITY. Per un corretto utilizzo sono indispensabili i seguenti prodotti:

6.1 Reagenti

Per eseguire il test RIDA®UNITY Norovirus I & II sono necessari i seguenti reagenti:

| Reagenti | Numero di catalogo |
|---|--------------------|
| RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG) | UN0001 |
| RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG) | UN0010 |

6.2 Attrezzatura di laboratorio

Per eseguire il test RIDA®UNITY Norovirus I & II è necessaria la seguente attrezzatura:

| Attrezzatura |
|--|
| Sistema RIDA®UNITY; numero di catalogo: ZUNITY (R-Biopharm AG) |
| Materiali di consumo RIDA®UNITY (puntali, piastre, cuvette di reazione, pellicole). Consultare le istruzioni per l'uso del sistema RIDA®UNITY, informazioni per l'ordine dei materiali di consumo. |
| Agitatore a vortice |
| Centrifuga da tavolo |
| Guanti monouso senza talco |

| Ciclatore esterno (possibile potenziamento del sistema) |
|---|
| CFX96™ Dx (Bio-Rad) |

Il kit RIDA®UNITY Norovirus I & II può essere utilizzato insieme ad altri ciclatori compatibili. Gli strumenti alternativi per la PCR real-time devono essere verificati/convalidati dall'utente. Contattare R-Biopharm AG all'indirizzo pcr@r-biopharm.de per verificare la compatibilità.

7. Avvertenze e misure precauzionali

Uso per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.

Nell'esecuzione del test, attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.

Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.

Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test.

Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.

Evitare di contaminare i campioni e i componenti del kit con microbi e nucleasi (DNasi/RNasi).

I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.

Non scambiare o mescolare i componenti (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) di un lotto di un kit con i componenti di un altro lotto.

Il kit di test può essere utilizzato per 8 settimane dalla prima apertura (può essere ricaricato fino a 6 volte). Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza. Queste specifiche sono controllate anche dal sistema RIDA®UNITY.

Gli operatori sono tenuti al corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Ulteriori dettagli sulla scheda di dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) sono disponibili cercando il codice articolo alla pagina

<https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Per gli utenti nell'Unione europea: segnalare tutti gli eventi avversi gravi associati al prodotto a R-Biopharm AG e alle autorità nazionali competenti.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

Per ottenere le migliori prestazioni dal test RIDA[®]UNITY Norovirus I & II, si raccomanda di utilizzare materiale campione fresco.

Evitare di congelare e scongelare ripetutamente il campione.

Evitare l'uso di terreni di trasporto contenenti conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti o detergenti in quanto queste sostanze potrebbero creare interferenze con i test RIDA[®]UNITY.

Si raccomanda di produrre aliquote dei campioni per evitare ripetuti scongelamenti e congelamenti. I campioni congelati devono essere scongelati immediatamente prima dell'estrazione per evitare la degradazione degli acidi nucleici.

Seguire le istruzioni per la conservazione dei campioni nelle Tabelle 3-6.

Tabella 3: Conservazione dei campioni - rivelazione di Norovirus GI

| Campioni nativi - feci | | |
|------------------------|------------|--------------|
| 20-25 °C | 2-8 °C | -20 / -80 °C |
| ≤ 7 giorni | ≤ 9 giorni | ≤ 6 mesi |

| Nell'eluato (dalle feci) | | |
|--------------------------|----------|----------|
| 30 °C | 2-8 °C | -20 °C |
| ≤ 24 ore | ≤ 36 ore | ≤ 1 mese |

Se la conservazione avviene a -20 / -80 °C, il congelamento e scongelamento del campione di feci ripetuto per un massimo di 5 volte non influisce sulle proprietà del test.

Se la conservazione avviene a -20 °C, il congelamento e scongelamento dell'eluato (dalle feci) ripetuto per un massimo di 3 volte non influisce sulle proprietà del test.

Tabella 4: Conservazione dei campioni - rivelazione di Norovirus GII

| Campioni nativi - feci | | |
|------------------------|------------|--------------|
| 20-25 °C | 2-8 °C | -20 / -80 °C |
| ≤ 7 giorni | ≤ 9 giorni | ≤ 6 mesi |

| Nell'eluato (dalle feci) | | |
|--------------------------|----------|----------|
| 30 °C | 2-8 °C | -20 °C |
| ≤ 24 ore | ≤ 36 ore | ≤ 1 mese |

Se la conservazione avviene a -20 / -80 °C, il congelamento e scongelamento del campione di feci ripetuto per un massimo di 5 volte non influisce sulle proprietà del test.

Se la conservazione avviene a -20 °C, il congelamento e scongelamento dell'eluato (dalle feci) ripetuto per un massimo di 3 volte non influisce sulle proprietà del test.

8.1 Preparazione del DNA da campioni di feci

Per isolare il DNA da campioni fecali, utilizzare il RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Seguire le procedure indicate nelle istruzioni per l'uso del RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (sezione: Preparazione dell'acido nucleico da campioni fecali).

9. Esecuzione del test

Iniziare posizionando sia i campioni sia i reagenti del kit RIDA®UNITY Norovirus I & II sul sistema RIDA®UNITY.

Prima di procedere, mescolare adeguatamente **Reaction Mix**, **Negative Control** e **Positive Control** utilizzando un agitatore a vortice. Non agitare l'**Enzyme Mix**.

Successivamente, centrifugare brevemente tutti i componenti.

Le provette PCR per i campioni da esaminare devono essere posizionate preventivamente nel ciclatore PCR integrato.

Per caricare correttamente il sistema con i reagenti e i materiali di consumo sono disponibili dei supporti. Per il processo di caricamento, seguire le istruzioni del sistema RIDA®UNITY. Osservare le sezioni pertinenti del manuale del sistema RIDA®UNITY (sezione: Esecuzione di un ciclo).

Il test RIDA®UNITY Norovirus I & II può essere utilizzato solo in combinazione con il RIDA®UNITY Internal Control Kit. Questo consente di riconoscere tempestivamente la potenziale inibizione della PCR, di verificare l'integrità del reagente e di confermare l'avvenuta estrazione dell'acido nucleico. La procedura è descritta nelle istruzioni per l'uso del RIDA®UNITY Internal Control Kit (sezione: Esecuzione del test).

La processazione automatizzata è descritta nel manuale del sistema RIDA®UNITY (sezione: Esecuzione di un ciclo).

9.1 Impostazioni del dispositivo

9.1.1 Profilo PCR real-time universale

Per armonizzare i test RIDA®UNITY, il test RIDA®UNITY Norovirus I & II è stato verificato esclusivamente nel profilo universale. Questo rende possibile combinare tra loro i test del DNA e dell'RNA. In generale, quindi, la trascrizione inversa è il primo passaggio del profilo universale.

Tabella 7: Profilo universale di PCR real-time per RIDA®UNITY

| | |
|---|---------------|
| <u>Trascrizione inversa</u> | 10 min, 58 °C |
| Denaturazione iniziale | 1 min, 95 °C |
| Cicli | 45 cicli |
| <u>PCR</u> Denaturazione | 10 s, 95 °C |
| Appaiamento/estensione | 15 s, 60 °C |
| Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa | Massima |

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tabella 8: Profilo di PCR real-time universale per CFX96™ Dx

| | |
|---|---------------|
| <u>Trascrizione inversa</u> | 10 min, 58 °C |
| Denaturazione iniziale | 1 min, 95 °C |
| Cicli | 45 cicli |
| <u>PCR</u> Denaturazione | 15 s, 95 °C |
| Appaiamento/estensione | 30 s, 60 °C |
| Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa | Massima |

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.2 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

| Strumento per la PCR real-time | Rivelazione | Canale di rivelazione | Nota |
|---------------------------------------|--------------------|------------------------------|------------------|
| R-Biopharm RIDA®UNITY | Norovirus GII | FAM | Canale SEEK GGII |
| | Internal Control | HEX | Canale SEEK ICD |
| | Norovirus GI | Cy5 | Canale SEEK GGI |
| Bio-Rad CFX96™ Dx | Norovirus GII | FAM | Canale SEEK GGII |
| | Internal Control | VIC | Canale SEEK ICD |
| | Norovirus GI | Cy5 | Canale SEEK GGI |

10. Controllo qualità - indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

I campioni vengono valutati con il software di analisi RIDA®SEEK del sistema RIDA®UNITY. Perché l'esecuzione sia valida, **Negative Control** e **Positive Control** devono mostrare i risultati corretti (vedere Tabella 9).

Il **Positive Control** è presente a una concentrazione di 10^3 copie/ μ L. Viene utilizzato in una quantità totale di 5×10^3 copie in ogni ciclo di PCR.

Il **Negative Control** contiene già il RIDA®UNITY Internal Control. Poiché i controlli non contengono un modello, non devono essere previsti segnali nei canali target. È indispensabile la presenza di segnali positivi nel canale IC con cui viene rivelato il controllo interno (vedere Tabella 10).

Tabella 10: Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

| Campione | Risultato | Ct IC | Ct gene target |
|--------------------|-----------|-------------------|------------------------------------|
| Controllo positivo | + | non disponibile * | Vedere il Certificate of Analysis. |
| Controllo negativo | - | Ct > 20 | 0 |

* In alcune circostanze, il canale IC può avere un segnale positivo nel controllo positivo e quindi non deve essere valutato.

Se il controllo positivo non rientra nell'intervallo Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, tutte le reazioni, compresi i controlli, devono essere rianalizzate nella PCR.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, tutte le reazioni, compresi i controlli, devono essere rianalizzate nella PCR.

Se i valori specificati non sono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare quanto segue:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata
- Correttezza della procedura di esecuzione del test

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo aver ripetuto il test, rivolgersi al fabbricante o al proprio distributore R-Biopharm locale.

11. Valutazione e interpretazione

La valutazione e l'interpretazione del campione avvengono utilizzando RIDA®SEEK, il software di analisi del sistema RIDA®UNITY.

Non esiste un metodo di riferimento o un materiale di riferimento attualmente riconosciuto a livello internazionale per la standardizzazione. La riferibilità metrologica dei materiali di controllo si avvale degli standard interni di R-Biopharm AG basati su specifici ampliconi sintetici di RNA.

Per ulteriori informazioni sulla riferibilità metrologica contattare R-Biopharm AG.

Per conoscere i valori specificati, gli intervalli e ulteriori dettagli consultare il Certificate of Analysis (CoA).

Tabella 11: Interpretazione del risultato *

| Rivelazione di | | | |
|----------------|--------------|-----|--|
| Norovirus GII | Norovirus GI | IC | Risultato |
| + | - | +/- | Norovirus GII ¹ rivelabile |
| - | + | +/- | Norovirus GI rivelabile |
| + | + | +/- | Norovirus GII ¹ e Norovirus GI rivelabili |
| - | - | + | Geni target non rivelabili |
| - | - | - | Non valido |

* + = positivo

- = negativo

¹ Vedere Limiti del metodo (Sezione 10)

Un campione è positivo se l'RNA del campione e l'**Internal Control** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Un campione è positivo anche se l'RNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma non è presente nessun segnale di amplificazione per l'**Internal Control** nel sistema di rivelazione. In questo caso non è necessario rivelare l'**Internal Control** perché elevate concentrazioni dell'amplicone possono rendere debole o assente il segnale dell'**Internal Control**.

Un campione è negativo se l'RNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale di amplificazione per l'**Internal Control** nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell'**Internal Control** esclude l'inibizione della reazione PCR e una precedente estrazione.

Un campione non è valido se né l'RNA del campione né l'Internal Control mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene inibitori o si è verificato un errore durante il processo di estrazione.

12. Limiti del metodo

1. Il test RIDA[®]UNITY Norovirus I & II rivela l'RNA dei norovirus GI e norovirus GII in campioni fecali umani non trattati. Pertanto, non è possibile dedurre una correlazione tra il livello di un determinato valore Ct e la presenza di sintomi clinici gravi. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati in combinazione con la sintomatologia clinica nel suo complesso.
2. La diagnosi non dovrebbe basarsi solo sul risultato del test biologico molecolare, ma dovrebbe sempre tenere conto dell'anamnesi e dei sintomi del paziente.
3. Questo test è approvato solo per la processazione automatizzata con il sistema RIDA[®]UNITY.
4. Questo test è verificato e convalidato solo per campioni fecali.
5. Procedure inadeguate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni al di sotto della sensibilità analitica del test possono produrre falsi negativi.
6. La presenza di inibitori della PCR può portare a risultati falsi negativi o non validi.
7. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, concentrazioni delle sequenze target sotto il limite di rivelabilità (LoD 95%) possono comunque essere rivelate, ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.
8. Mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione di varianti nuove o sconosciute e possono portare a risultati falsi negativi con RIDA[®]UNITY Norovirus I & II.
9. Un risultato positivo del test non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un risultato positivo indica la presenza dei geni target (norovirus GI e GII, regione della giunzione ORF1/ORF2).
10. Il test RIDA[®]UNITY Norovirus I & II rivela anche i norovirus del genogruppo IV, che possono infettare l'uomo in casi molto rari.
11. Questo test deve essere eseguito in conformità con il regolamento sulle buone pratiche di laboratorio (BPL). Durante l'esecuzione del test, gli operatori devono seguire esattamente le istruzioni del fabbricante.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Prestazioni e caratteristiche cliniche

Il test di PCR real-time multiplex RIDA®UNITY Norovirus I & II è stato confrontato in un laboratorio esterno con un test di riferimento con marchio CE basato su 237 campioni fecali di pazienti con sintomi di infezione gastrointestinale.

I risultati mostrano un'elevata sensibilità e specificità per la rivelazione dei norovirus GI o GII in campioni fecali umani.

Tabella 12: Rivelazione del norovirus GI

| | | PCR di riferimento | | Totale |
|---|----------|--------------------|----------|--------|
| | | Positivo | Negativo | |
| RIDA®UNITY Norovirus I & II - Norovirus GI | Positivo | 33 | 0 | 33 |
| | Negativo | 3 | 201 | 204 |
| | Totale | 36 | 201 | 237 |

| | |
|-------------------------------|---------------------|
| Sensibilità relativa (IC 95%) | 91,7% (77,5%-98,2%) |
| Specificità relativa (IC 95%) | 100% (98,2%-100%) |

Tabella 13: Rivelazione del norovirus GII

| | | PCR di riferimento | | Totale |
|--|----------|--------------------|----------|--------|
| | | Positivo | Negativo | |
| RIDA®UNITY Norovirus I & II - Norovirus GII | Positivo | 126 | 0 | 126 |
| | Negativo | 4 | 107 | 111 |
| | Totale | 130 | 107 | 237 |

| | |
|-------------------------------|---------------------|
| Sensibilità relativa (IC 95%) | 96,9% (92,3%-99,2%) |
| Specificità relativa (IC 95%) | 100% (96,6%-100%) |

13.2 Prestazioni e caratteristiche analitiche

13.2.1 Limite di rivelabilità (LoD 95%)

Un campione positivo (pool fecale negativo addizionato con campioni fecali clinici positivi) è stato misurato in cinque fasi di diluizione (in fasi di 0,25-log) per ogni target con 20 replicati per fase in un lotto per determinare il LoD. Ha fatto seguito un'analisi probit. Successivamente, il LoD calcolato è stato confermato con 20 replicati per target per la fase/concentrazione di diluizione calcolata.

Per la rivelazione dell'RNA di norovirus GI e norovirus GII utilizzando il test RIDA®UNITY Norovirus I & II sul sistema UNITY, sono stati identificati i seguenti limiti di rivelabilità (LoD).

I risultati di queste misurazioni sono mostrati nella Tabella 15.

Tabella 15: Risultati del limite di rivelabilità del test RIDA®UNITY Norovirus I & II per i parametri norovirus GI e norovirus GII in campioni di feci.

| | Norovirus GI | Norovirus GII |
|-----|---------------------------------------|--------------------------------------|
| LoD | 4,85E-04 [fattore di diluizione]** | 5,98E-05 [fattore di diluizione]* |

(*) Diluizione relativa della concentrazione madre. Campione clinico positivo con intervallo Ct 26-27

(**) Diluizione relativa della concentrazione madre. Campione clinico positivo con intervallo Ct 30-31

Il LoD per il parametro norovirus GI nei campioni di feci è stato determinato a 4,85E-04 [fattore di diluizione].

Il LoD per il parametro norovirus GII nei campioni di feci è stato determinato a 5,98E-05 [fattore di diluizione].

Per il flusso di lavoro migliorato con CFX96™ Dx, questi valori di LoD sono stati confermati nell'ipotesi di rimanere in un intervallo di LoD di 2-3 volte.

13.2.2 Specificità analitica

Sostanze interferenti

La presenza di inibitori della PCR e di sostanze interferenti può portare a risultati falsi negativi o non validi. Quindi, sono stati studiati gli effetti di diverse sostanze che potrebbero essere presenti perché ampiamente utilizzate nelle infezioni gastrointestinali o a causa della loro presenza diffusa nei campioni corrispondenti. Le sostanze che potrebbero influenzare in modo significativo i risultati del test sono state esaminate inizialmente ad alte concentrazioni (il triplo della dose giornaliera o la simulazione del caso peggiore) in un'analisi di interferenza. Non sono state individuate interferenze per le sostanze elencate nella Tabella 16.

Tabella 16: Sostanze potenzialmente interferenti

| Sostanza potenzialmente interferente | Concentrazione |
|--|-----------------------|
| Ciprofloxacina-ratiopharm® compresse rivestite con film da 500 mg (ciprofloxacina) | 0,375% [p/v] |
| Etanolo | 5% in base all'eluato |
| Guanidinio cloridrato | 5% in base all'eluato |
| Sangue umano | 5% [v/v] |
| Mucine | 5% [p/v] |
| Stearina/acido palmitico | 40% [p/v] |

Reazioni crociate

Sono stati studiati vari organismi (batteri, parassiti e virus) che si possono trovare comunemente nella matrice fecale. I microrganismi da studiare per questo test sono stati scelti perché si trovano naturalmente nei campioni di feci o causano sintomi corrispondenti ai patogeni gastrointestinali. Per le analisi sono stati utilizzati colture batteriche (tra 10^7 e 10^9 CFU/mL) e colture fungine o isolati virali (da campioni fecali positivi) dei rispettivi organismi.

Il test di PCR real-time multiplex RIDA®UNITY Norovirus I & II è specifico per norovirus GI e norovirus GII. Non sono state rivelate reattività crociate con le seguenti specie (vedere Tabella 17):

Tabella 17: Organismi potenzialmente cross-reattivi

| Organismo | Risultato del test * | |
|----------------------------------|----------------------|---------------|
| | 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> (sierotipo Enteritidis) | - | - |
| <i>Salmonella enterica</i> (sierotipo 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 Precisione

La precisione del test di PCR real-time RIDA®UNITY Norovirus I & II è stata determinata per i seguenti livelli di considerazione.

Precisione *intra*-test: determinazione di 5 campioni di controllo con 20 replicati ciascuno su RIDA®UNITY in condizioni identiche.

Precisione *inter*-test: determinazione di 5 campioni di controllo in 20 cicli in duplicato in 10 giorni (2 cicli al giorno) eseguiti su strumenti diversi in condizioni riproducibili.

I test di precisione *intra*-test e *inter*-test sono stati condotti utilizzando tre diversi lotti.

I coefficienti di variazione ottenuti per le rispettive misurazioni effettuate con il test di PCR real-time RIDA®UNITY Norovirus I & II sono stati non superiori al 4,82% su RIDA®UNITY e non superiori al 3,25% su CFX96™ Dx.

Tabella 18: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Norovirus I & II per norovirus GI (sistema RIDA®UNITY)

| Valore medio Ct / CV | <i>Intra</i> -test | | | <i>Inter</i> -test | | | <i>Inter</i> -lotto | |
|----------------------|--------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|---------------------|----------|
| | Lotto kit 1 | Lotto kit 2 | Lotto kit 3 | Lotto kit 1 | Lotto kit 2 | Lotto kit 3 | Lotti kit 1-3 | |
| 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 (%) | / | / | / | / | / | / | / |

Tabella 19: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Norovirus I & II per norovirus GI (CFX96™ Dx)

| Valore medio Ct / CV | | Intra-test | | | Inter-test | | | Inter-lotto |
|----------------------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| | | Lotto kit 1 | Lotto kit 2 | Lotto kit 3 | Lotto kit 1 | Lotto kit 2 | Lotto kit 3 | Lotti kit 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 | Negativo |
| | CV (%) | / | / | / | / | / | / | / |

Tabella 20: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Norovirus I & II per norovirus GII (sistema RIDA®UNITY)

| Valore medio Ct / CV | | Intra-test | | | Inter-test | | | Inter-lotto |
|----------------------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| | | Lotto kit 1 | Lotto kit 2 | Lotto kit 3 | Lotto kit 1 | Lotto kit 2 | Lotto kit 3 | Lotti kit 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 | Negativo |
| | CV (%) | / | / | / | / | / | / | / |

Tabella 21: Risultati della precisione del test RIDA®UNITY Norovirus I & II per norovirus GII (CFX96™ Dx)

| Valore medio Ct / CV | | Intra-test | | | Inter-test | | | Inter-lotto |
|----------------------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| | | Lotto kit 1 | Lotto kit 2 | Lotto kit 3 | Lotto kit 1 | Lotto kit 2 | Lotto kit 3 | Lotti kit 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 | Negativo |
| | CV (%) | / | / | / | / | / | / | / |

13.2.4 Reattività analitica

La reattività del test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®UNITY Norovirus I & II è stata valutata su un gruppo definito di più genotipi di norovirus dei genogruppi I e II (vedere Tabella 22).

Tabella 22: Test di reattività analitica

| Ceppo | Risultato* | |
|---|---------------|--------------|
| | 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 (almeno 2 dei 3 replicati positivi)

- = negativo

14. Cronologia delle versioni

| Numero della versione | Sezione e denominazione |
|-----------------------|-------------------------|
| 2022-08-09 | Versione di rilascio |

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

| | |
|---|--|
|  | Uso per la diagnostica <i>in vitro</i> |
|  | Leggere le istruzioni per l'uso |
|  | Numero di lotto |
|  | Data di scadenza |
|  | Temperatura di conservazione |
|  | Numero di catalogo |
|  | Quantità di test |
|  | Data di produzione |
|  | Fabbricante |

Simboli specifici del test

| | |
|---|---------------------|
|  | Miscela di reazione |
|  | Miscela enzimatica |
|  | Controllo negativo |
|  | Controllo positivo |

16. Bibliografia

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).