

## RIDA® UNITY Norovirus I & II

**REF** UN1415



## 1. Przeznaczenie

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*. Test RIDA® UNITY Norovirus I & II, wykonywany na platformie RIDA® UNITY, to multipleksowa reakcja RT-PCR w czasie rzeczywistym do bezpośredniego jakościowego wykrywania i różnicowania RNA norowirusów z genogrupy I (GI) i II (GII) w nieprzygotowanych próbkach kału pobranych od osób z objawami ostrego zapalenia żołądka i jelit.

Test RIDA® UNITY Norovirus I & II jest przeznaczony do wspomagania diagnostyki różnicowej zakażeń norowirusami z genogrupy I (GI) i genogrupy II (GII) u pacjentów z objawami zapalenia żołądka i jelit w połączeniu z wynikami innych badań klinicznych i laboratoryjnych.

Wyniki ujemne nie wykluczają zakażenia norowirusami i nie powinny być wykorzystywane jako jedyna podstawa do postawienia rozpoznania.

Produkt ten jest przeznaczony do użytku profesjonalnego.

## 2. Podsumowanie i wyjaśnienie testu

Norowirusy są jedną z najczęstszych na świecie przyczyn niebakteryjnego zapalenia żołądka i jelit u osób w każdym wieku i co roku powodują około 70 000 do 200 000 zgonów.<sup>(1)</sup> Odpowiadają za około 20% wszystkich przypadków ostrego zapalenia żołądka i jelit na całym świecie. Ludzkie norowirusy, wcześniej nazywane wirusami Norwalk, zostały po raz pierwszy zidentyfikowane w 1972 r. w próbkach kału pobranych podczas epidemii zapalenia żołądka i jelit w Norwalk, Ohio, USA, co czyni je pierwszymi patogenami wirusowymi, w przypadku których udowodniono, że powodują one zapalenie żołądka i jelit.<sup>(2)</sup>

Norowirusy należą do rodziny *Caliciviridae* i są małymi, bezotoczkowymi wirusami z jednoniciowym RNA (ssRNA). Na podstawie sekwencji genetycznych wirusowej zależnej od RNA polimerazy RNA i białka kapsydu, norowirusy są podzielone na 10 genogrup (GI do GX), przy czym obecnie znanych jest ponad 49 różnych genotypów (9 × GI, 27 × GII, 3 × GIII, 2 × GIV, 2 × GV, 2 × GVI i 1 genotyp dla GVII, GVIII, GIX [dawniej GII.15] i GX) oraz różnych szczepów. Genogrupy I, II, a czasem IV są najważniejsze z punktu widzenia patogenności dla człowieka.<sup>(1)</sup> W Stanach Zjednoczonych ponad 99% wszystkich epidemii norowirusów jest powodowanych przez wirusy z genogrup GI i GII.<sup>(3)</sup> Zapalenie żołądka i jelit wywołane przez norowirusy jest często spowodowane obecnością wirionów w kale i wymiocinach, a do spowodowania zachorowania wystarczy tylko 10 cząstek zakaźnych. Wysoka stabilność w środowisku i niska dawka infekcyjna odpowiadają za wysoką transmisyjność norowirusów.<sup>(4)</sup> Typowe objawy infekcji norowirusem to biegunka, wymioty i nudności.<sup>(3)</sup>

### 3. Zasada testu

RIDA<sup>®</sup>UNITY Norovirus I & II multiplex real-time RT-PCR to molekularna diagnostyczna reakcja PCR służąca do bezpośredniego jakościowego wykrywania i różnicowania RNA norowirusów z genogrupy I (GI) RNA i norowirusów z genogrupy II (GII) oraz RNA GIV w próbkach kału człowieka. Przetwarzanie jest w pełni zautomatyzowane dzięki systemowi RIDA<sup>®</sup>UNITY. Najpierw kwasy nukleinowe są ekstrahowane przy użyciu RIDA<sup>®</sup>UNITY Universal Extraction Kit i zestawu kontroli wewnętrznej. Sekwencja docelowa jest wykrywana w jednoetapowym formacie RT-PCR w czasie rzeczywistym, co oznacza, że najpierw odbywa się odwrotna transkrypcja (RT), a następnie PCR, które są przeprowadzane w jednej fiołce reakcyjnej. W tym procesie wyizolowany RNA jest transkrybowany do cDNA za pomocą odwrotnej transkryptazy. Fragmenty genów swoiste dla norowirusa GI i GII/GIV są następnie amplifikowane przy użyciu PCR w czasie rzeczywistym. Zamplifikowane sekwencje docelowe (region połączenia ORF1/ORF2) są wykrywane przy użyciu sond hydrolitycznych wyznakowanych wygaszaczem na jednym końcu i do fluorescencyjnego barwnika reporterowego (fluoroforu) na drugim końcu. W obecności sekwencji docelowej sondy hybrydują z amplikonem. Podczas etapu ekstensji Taq Polymerase oddziela reporter od wygaszacza. Reporter emituje sygnał fluorescencyjny, który jest wykrywany przez jednostkę optyczną aparatu do PCR w czasie rzeczywistym. Natężenie sygnału fluorescencyjnego wzrasta wraz z ilością powstających amplikonów. RIDA<sup>®</sup>UNITY Internal Control Kit musi być używany w tym samym czasie, aby móc sprawdzić przygotowanie próbki i/lub potencjalną inhibicję PCR.

### 4. Dostarczane odczynniki

Odczynniki w zestawie wystarczają na 96 oznaczeń\*.

**Tabela 1:** Dostarczane odczynniki

NR KAT.	Odczynnik	Ilość		Kolor pokrywki
UNZ1415RM	Reaction Mix	1 ×	1935 µL	żółty, gotowy do użycia
UNZ1415EM	Enzyme Mix	1 ×	350 µL	czerwony, gotowy do użycia
UNZ1415PC	Positive Control	1 ×	200 µL	niebieski, gotowy do użycia
UNZ1415NC	Negative Control	1 ×	450 µL	biały, gotowy do użycia

\* Przy wielokrotnym użyciu i w mniejszych seriach liczba reakcji może ulec zmniejszeniu.

## 5. Instrukcje dotyczące przechowywania

- Należy postępować zgodnie z wytycznymi dotyczącymi postępowania przedstawionymi w Tabeli 2 i przechowywać zestaw bezpośrednio po użyciu zgodnie z podanymi informacjami.
- Wszystkie odczynniki należy przechowywać z dala od światła w temperaturze od -16°C do -28°C. Nieotwarte odczynniki można zużyć do terminu ważności wydrukowanego na etykiecie. Po upływie terminu ważności nie można zagwarantować jakości.
- Wszystkie odczynniki należy ostrożnie rozmrozić przed użyciem (np. w lodówce w temperaturze 2 - 8°C).
- Wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie do 8 razy nie wpływa na właściwości testu.

**Tabela 2:** Warunki przechowywania i informacje

	<b>Temperatura przechowywania</b>	<b>Maksymalny czas przechowywania</b>
nieotwarte	-16 do -28°C	Można zużyć do wydrukowanego terminu ważności
po otwarciu	-16 do -28°C	8 cykli zamrażania-rozmrażania

## 6. Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

Test RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time RT-PCR jest przeznaczony wyłącznie do użytku z systemem RIDA®UNITY. Do prawidłowego stosowania bezwzględnie wymagane są następujące produkty:

### 6.1 Odczynniki

Do wykonania testu RIDA®UNITY Norovirus I & II potrzebne są następujące odczynniki:

Odczynniki	Nr kat.
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

### 6.2 Sprzęt laboratoryjny

Do wykonania testu RIDA®UNITY Norovirus I & II potrzebny jest następujący sprzęt:

Sprzęt
System RIDA®UNITY; nr kat.: ZUNITY (R-Biopharm AG)
Materiały eksploatacyjne RIDA®UNITY (końcówki, płytki, fiołki reakcyjne, folie). Informacje dotyczące zamawiania materiałów eksploatacyjnych, patrz instrukcja obsługi RIDA®UNITY.
Worteks
Wirówka stołowa
Jednorazowe rękawiczki bezpudrowe

Cykler zewnętrzny (możliwe rozszerzenie systemu)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Zestaw RIDA®UNITY Norovirus I & II może być używany w połączeniu z innymi kompatybilnymi cyklerami. Alternatywne instrumenty do PCR w czasie rzeczywistym muszą zostać zweryfikowane/zwalidowane przez użytkownika. Aby sprawdzić zgodność, należy skontaktować się z firmą R-Biopharm AG pod adresem [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Ostrzeżenia i środki ostrożności dla użytkowników

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.

Ten test może być wykonywany wyłącznie przez wykwalifikowany personel laboratoryjny. Należy przestrzegać wytycznych dotyczących pracy w laboratoriach medycznych.

Podczas wykonywania tego testu należy zawsze ściśle przestrzegać instrukcji użycia. Nie pipetować próbek ani odczynników ustami. Unikać kontaktu z uszkodzoną skórą i błonami śluzowymi.

Podczas pracy z odczynnikami i próbkami należy nosić osobiste wyposażenie ochronne (odpowiednie rękawiczki, fartuch laboratoryjny, okulary ochronne), a po wykonaniu testu - umyć ręce.

W miejscu, w którym przetwarzane są próbki nie wolno palić, jeść ani pić.

Należy unikać zanieczyszczenia próbek i składników zestawu drobnoustrojami i nukleazami (DNaza/RNaza).

Próbki kliniczne należy traktować jako potencjalnie zakaźne i odpowiednio je zutylizować, podobnie jak wszystkie odczynniki i materiały, które mają kontakt z potencjalnie zakaźnymi próbkami.

Nie należy wymieniać ani mieszać odczynników (Reaction Mix, Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, ujemny Control) z danej partii zestawu z inną partią.

Zestaw testowy może być używany przez 8 tygodni od pierwszego otwarcia (zestaw można ładować do 6 razy). Nie używać zestawu testu po upływie terminu ważności. Specyfikacje te są również sprawdzane przez system RIDA<sup>®</sup>UNITY.

Użytkownicy ponoszą odpowiedzialność za prawidłową utylizację wszystkich odczynników i materiałów po użyciu. W przypadku utylizacji należy przestrzegać przepisów krajowych.

Dalsze szczegóły dotyczące karty charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) można znaleźć pod numerem pozycji na stronie <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Dotyczy użytkowników w Unii Europejskiej: Wszystkie poważne zdarzenia niepożądane związane z produktem należy zgłaszać firmie R-Biopharm AG oraz odpowiednim organom krajowym.

## 8. Pobieranie i przechowywanie próbek

Zaleca się użycie świeżego materiału próbki, aby uzyskać najlepszą skuteczność testu RIDA®UNITY Norovirus I & II.

Należy unikać wielokrotnego zamrażania/rozmrężania próbki.

Nie należy pobierać próbek kału do pojemników transportowych zawierających pożywkę transportową ze środkami konserwującymi, surowicą zwierzęcą, jonami metali, środkami utleniającymi lub detergentami, ponieważ takie substancje mogą zakłócać test RIDA®UNITY.

Zaleca się przygotowanie porcji próbek, aby uniknąć wielokrotnego rozmrażania i zamrażania. Zamrożone próbki należy rozmrozić bezpośrednio przed ekstrakcją, aby zapobiec rozkładowi kwasu nukleinowego.

Należy postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi przechowywania próbek, podanymi w Tabelach od 3 do 6.

**Tabela 3:** Przechowywanie próbek - wykrywanie norowirusa GI

Próbki natywne - kał		
20 - 25°C	2 - 8°C	20 / -80°C
≤7 dni	≤9 dni	≤6 miesięcy

W eluacie (z kału)		
30°C	2 - 8°C	-20°C
≤24 godzin	≤36 godzin	≤1 miesiąc

Przy przechowywaniu w temperaturze -20°C/ -80°C wielokrotne zamrażanie/rozmrężanie próbki kału do 5 razy nie wpływa na właściwości testu.

Przy przechowywaniu w temperaturze -20°C wielokrotne zamrażanie/rozmrężanie eluatu (z kału) do 3 razy nie wpływa na właściwości testu.

**Tabela 4:** Przechowywanie próbek - wykrywanie norowirusa GII

Próbki natywne - kał		
20 - 25°C	2 - 8°C	20 / -80°C
≤7 dni	≤9 dni	≤6 miesięcy

W eluacie (z kału)		
30°C	2 - 8°C	-20°C
≤24 godzin	≤36 godzin	≤1 miesiąc

Przy przechowywaniu w temperaturze -20 / -80°C wielokrotne zamrażanie/rozmrężanie próbki kału do 5 razy nie wpływa na właściwości testu.

Przy przechowywaniu w temperaturze -20°C wielokrotne zamrażanie/rozmarzanie eluatu (z kału) do 3 razy nie wpływa na właściwości testu.

### 8.1 Przygotowanie DNA z próbek kału

Aby wyizolować DNA z próbek kału, należy użyć RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Postępować zgodnie z prawidłowymi procedurami zawartymi w instrukcji obsługi RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (punkt: Przygotowanie kwasów nukleinowych z próbek kału).

## 9. Procedura testu

Zarówno próbki, jak i odczynniki zestawu RIDA®UNITY Norovirus I & II w systemie RIDA®UNITY na początku stosowania.

Wcześniej należy odpowiednio wymieszać **Reaction Mix**, **Negative Control** i **Positive Control** za pomocą wortexu. Nie należy wortexować **Enzyme Mix**. Następnie krótko odwirować wszystkie składniki.

Probówki do PCR na badane próbki muszą zostać wcześniej umieszczone w zintegrowanym cyklerze PCR.

Dostępne są nośniki do prawidłowego ładowania systemu odczynniki i materiałami eksploatacyjnymi. Podczas procesu ładowania należy postępować zgodnie z instrukcjami systemu RIDA®UNITY. Należy zapoznać się z odpowiednimi punktami w podręczniku systemu RIDA®UNITY (punkt: Wykonywanie cyklu).

Test RIDA®UNITY Norovirus I & II może być używany tylko w połączeniu z RIDA®UNITY Internal Control Kit. Pozwala to na wczesne rozpoznanie potencjalnej inhibicji PCR, weryfikację integralności odczynnika i potwierdzenie pomyślnej ekstrakcji kwasu nukleinowego. Procedura jest opisana w instrukcji obsługi RIDA®UNITY Internal Control Kit (punkt: Procedura testu).

Automatyczne przetwarzanie jest opisane w podręczniku systemu RIDA®UNITY (punkt: Wykonywanie cyklu).



## 9.1 Ustawienia urządzenia

### 9.1.1 Uniwersalny profil PCR w czasie rzeczywistym

Aby zharmonizować testy RIDA®UNITY, test RIDA®UNITY Norovirus I & II został zweryfikowany w profilu uniwersalnym. Umożliwia to łączenie testów DNA i RNA. Ogólnie rzecz biorąc, dlatego odwrotna transkrypcja działa jako pierwsza w profilu uniwersalnym.

**Tabela 7:** Uniwersalny profil PCR w czasie rzeczywistym dla RIDA®UNITY

<u>Odwrotna transkrypcja</u>	10 min, 58°C
Wstępna denaturacja	1 min, 95°C
Cykle	45 cykli
<u>PCR</u> Denaturacja	10 s, 95°C
Annealing/ekstensja	15 s, 60°C
Szybkość zmiany temperatury/szybkość narastania	Maksymalny

**Uwaga:** Annealing i ekstensja odbywają się na tym samym etapie.

**Tabela 8:** Uniwersalny profil PCR w czasie rzeczywistym w przypadku aparatu CFX96™ Dx

<u>Odwrotna transkrypcja</u>	10 min, 58°C
Wstępna denaturacja	1 min, 95°C
Cykle	45 cykli
<u>PCR</u> Denaturacja	15 s, 95°C
Annealing/ekstensja	30 s, 60°C
Szybkość zmiany temperatury/szybkość narastania	Maksymalny

**Uwaga:** Annealing i ekstensja odbywają się na tym samym etapie.

## 9.2 Ustawienie kanału wykrywania

Tabela 9: Dobór odpowiednich kanałów wykrywania

Aparat do PCR w czasie rzeczywistym	Wykrywanie	Kanał wykrywania	Uwaga
<b>R-Biopharm RIDA®UNITY</b>	Norovirus GII	FAM	SEEK, kanał GGII
	Kontrola wewnętrzna	HEX	SEEK, kanał ICD
	Norovirus GI	Cy5	SEEK, kanał GGI
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	Norovirus GII	FAM	SEEK, kanał GGII
	Kontrola wewnętrzna	VIC	SEEK, kanał ICD
	Norovirus GI	Cy5	SEEK, kanał GGI

## 10. Kontrola jakości - wskazanie niestabilności lub upływu terminu ważności odczynników

Próbki są oceniane przy użyciu oprogramowania analitycznego RIDA®SEEK systemu RIDA®UNITY. **Negative Control** i **Positive Control** muszą dać prawidłowe wyniki (patrz Tabela 9).

Odczynnik **Positive Control** jest dostępny w stężeniu  $10^3$  kopii/ $\mu\text{L}$ . Jest on używany w ilości łącznej  $5 \times 10^3$  kopii w każdym cyklu PCR.

**Negative Control** zawiera już kontrolę wewnętrzną RIDA®UNITY. Ponieważ kontrole nie zawierają matrycy, nie należy oczekiwać żadnych sygnałów w kanałach docelowych. Niezbędne są dodatnie sygnały w kanale IC, za pomocą którego wykrywana jest kontrola wewnętrzna (patrz Tabela 10).

**Tab. 10:** Prawidłowy przebieg reakcji PCR musi spełniać następujące warunki:

Próbka	Wynik	IC Ct	Ct genu docelowego
Kontrola dodatnia	+	Nie dotyczy*	Patrz: certyfikat analizy (Certificate of Analysis, CoA)
Kontrola ujemna	-	Ct > 20	0

\* W pewnych okolicznościach kanał IC może mieć sygnał dodatni w kontroli dodatniej i dlatego nie powinien być oceniany.

Jeżeli kontrola dodatnia nie mieści się w określonym zakresie Ct, ale kontrola ujemna jest ważna, należy ponownie przeanalizować w PCR wszystkie reakcje, w tym kontrole.

Jeśli kontrola ujemna nie jest ujemna, ale kontrola dodatnia jest ważna, wszystkie reakcje, w tym kontrole muszą zostać ponownie przeanalizowane za pomocą PCR.

Jeśli określone wartości nie zostaną osiągnięte, przed powtórzeniem testu należy sprawdzić następujące elementy:

- Termin ważności użytych odczynników;
- Funkcjonalność używanego sprzętu
- Prawidłowość procedury testu;

Jeśli po powtórzeniu testu warunki nadal nie są spełnione, należy skonsultować się z producentem lub lokalnym dystrybutorem firmy R-Biopharm.

## 11. Ocena i interpretacja

Oceny i interpretacji próbek dokonuje się przy użyciu oprogramowania analitycznego systemu RIDA®UNITY, RIDA®SEEK.

Nie istnieje obecnie międzynarodowo uznana metoda referencyjna ani materiał referencyjny do standaryzacji. Materiały kontrolne można metrologicznie powiązać z wewnętrznymi wzorcami firmy R-Biopharm AG w , oparciu o określone syntetyczne amplikony RNA.

Aby uzyskać więcej informacji na temat identyfikowalności metrologicznej, należy skontaktować się z firmą R-Biopharm AG.

Podane wartości, zakresy i dalsze szczegółowe informacje można znaleźć w certyfikacie analizy (Certificate of Analysis, CoA).

**Tab. 11:** Interpretacja wyników\*

Wykrywanie			
Norovirus GII	Norovirus GI	IC	Wynik
+	-	+/-	Wykrywalny Norovirus GII <sup>1</sup>
-	+	+/-	Wykrywalny Norovirus GI
+	+	+/-	Wykrywalne Norovirus GII <sup>1</sup> i Norovirus GI
-	-	+	Geny docelowe niewykrywalne
-	-	-	Nieważny

\* + = dodatni

- = ujemny

<sup>1</sup> Patrz „Ograniczenia metody” (punkt 10).

Próbka jest oceniana jako dodatnia, jeśli RNA w próbce i  wykazują sygnał amplifikacji w systemie wykrywania.

Próbka jest również dodatnia, jeśli próbka RNA w próbce wykazuje sygnał amplifikacji, ale nie widać sygnału wzmocnienia dla  w systemie wykrywania. Wykrywanie  jest w tym przypadku konieczne, ponieważ wysokie stężenia amplikonu mogą powodować słaby sygnał albo brak sygnału .

Próbka jest oceniana jako ujemna, jeśli RNA w próbce nie wykazuje sygnału amplifikacji, ale w systemie wykrywania można znaleźć sygnał amplifikacji dla . Inhibicję reakcji PCR i wcześniejszej ekstrakcji można wykluczyć na podstawie wykrycia .

Próbka jest nieważna, jeśli RNA w próbce próbce i **Internal Control** nie wykazują sygnału amplifikacji w systemie wykrywania. W próbce występują inhibitory albo wystąpił błąd podczas procesu ekstrakcji.

## 12. Ograniczenia metody

1. Test RIDA<sup>®</sup> UNITY Norovirus I & II wykrywa RNA norowirusów GI i norowirusów GII w nieprzygotowanych próbkach kału człowieka. Na tej podstawie nie można wyciągać wniosków na temat związku pomiędzy poziomem wyznaczonej wartości Ct a występowaniem ciężkich objawów klinicznych. Uzyskane wyniki należy zawsze interpretować z uwzględnieniem pełnego obrazu klinicznego.
2. Rozpoznanie nie powinno opierać się wyłącznie na wyniku analizy metodami biologii molekularnej, ale zawsze powinna uwzględniać historię choroby pacjenta i objawy.
3. Ten test jest zatwierdzony tylko do automatycznego przetwarzania przy użyciu systemu RIDA<sup>®</sup>UNITY.
4. Ten test został zweryfikowany i zwalidowany tylko dla próbek kału.
5. Nieprawidłowe pobieranie, transport i przechowywanie próbek oraz postępowanie z próbkami lub miano patogenu poniżej czułości analitycznej testu może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych.
6. Obecność inhibitorów PCR może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych lub nieważnych.
7. Podobnie jak w przypadku wszystkich testów diagnostycznych *in vitro* opartych na PCR, możliwe jest wykrycie skrajnie niskich stężeń sekwencji docelowych, mieszczących się poniżej granicy wykrywalności (LoD 95%). Uzyskane wyniki nie zawsze są powtarzalne.
8. Mutacje lub polimorfizmy w regionie startera lub miejscu wiązania sondy mogą zakłócać wykrywanie nowych lub nieznanych wariantów oraz doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych przy użyciu testu RIDA<sup>®</sup>UNITY Norovirus I & II.
9. Dodatni wynik testu nie musi wskazywać na obecność żywych drobnoustrojów. Wynik dodatni wskazuje, że obecne są geny docelowe (norowirus GI i GII, region połączenia ORF1/ORF2).
10. Norowirusy z genogrupy IV, które w bardzo rzadkich przypadkach mogą również wywoływać zakażenia u ludzi można podobnie wykrywać za pomocą RIDA<sup>®</sup>UNITY Norovirus I & II.
11. Test ten należy wykonać zgodnie z rozporządzeniem w sprawie dobrej praktyki laboratoryjnej (GLP). Podczas wykonywania testu użytkownicy muszą dokładnie przestrzegać instrukcji producenta.

## 13. Charakterystyka działania

### 13.1 Charakterystyka działania klinicznego

Test RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time PCR został porównany w zewnętrznym laboratorium z testem referencyjnym posiadającym oznaczenie CE i opartym na 237 próbkach kału od pacjentów z objawami zakażenia przewodu pokarmowego.

Wyniki wykazują wysoką czułość i swoistość wykrywania norowirusów GI lub GII w próbkach kału człowieka.

**Tabela 12:** Wykrywanie norowirusów GI

		Referencyjna PCR		Razem
		Wynik dodatni	Wynik ujemny	
RIDA®UNITY Norovirus I & II - norowirus GI	Wynik dodatni	33	0	33
	Wynik ujemny	3	201	204
	Razem	36	201	237

Czułość względna (95% CI)	91,7% (77,5% - 98,2%)
Swoistość względna (95% CI)	100% (98,2% - 100%)

**Tabela 13:** Wykrywanie norowirusów GII

		Referencyjna PCR		Razem
		Wynik dodatni	Wynik ujemny	
RIDA®UNITY Norovirus I & II - norowirus GII	Wynik dodatni	126	0	126
	Wynik ujemny	4	107	111
	Razem	130	107	237

Czułość względna (95% CI)	96,9% (92,3% - 99,2%)
Swoistość względna (95% CI)	100% (96,6% - 100%)

## 13.2 Charakterystyka działania analitycznego

### 13.2.1 Granica wykrywalności (LoD 95%)

Dodatnią (ujemne próbki kału, z dodatkiem dodatnich próbek klinicznych) mierzono w pięciu etapach rozcieńczania (w krokach co 0,25 log) dla każdego celu z 20 powtórzeniami na etap w jednej partii w celu określenia LoD. Następnie przeprowadzono analizę probitową. Dalej obliczone LoD potwierdzono z 20 powtórzeniami na cel dla obliczonego kroku rozcieńczenia/stężenia.

Do wykrywania RNA norowirusa GI i GII przy użyciu testu RIDA® UNITY Norovirus I & II w systemie UNITY wyznaczono następujące granice wykrywalności (LoD). Wyniki tych pomiarów przedstawiono w Tabeli 15.

**Tabela 15:** Wyniki granicy wykrywalności testu RIDA® UNITY Norovirus I & II dla parametrów Norovirus GI i Norovirus w próbkach kału

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

(\* ) Względne rozcieńczenie stężenia podstawowego. Dodatnia próbka kliniczna z zakresem Ct 26 - 27

(\*\* ) Względne rozcieńczenie stężenia podstawowego. Dodatnia próbka kliniczna z zakresem Ct 30 - 31

LoD dla parametru Norovirus GI w próbkach kału ustalono na 4,85E-04 [współczynnik rozcieńczenia].

LoD dla parametru Norovirus GII w próbkach kału ustalono na 5,98E-05 [współczynnik rozcieńczenia]

W przypadku ulepszonego przepływu pracy przy użyciu aparatu CFX96™ Dx te wartości LoD zostały potwierdzone przy założeniu, że pozostaje się w 2-3-krotnym zakresie LoD.

### 13.2.2 Swoistość analityczna

#### Substancje zakłócające

Obecność inhibitorów PCR i substancji zakłócających może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych lub nieważnych. Dlatego zbadano wpływ różnych potencjalnie występujących substancji, biorąc pod uwagę ich powszechne stosowanie w leczeniu zakażeń przewodu pokarmowego lub powszechne występowanie w odpowiednich próbkach.

Substancje, które mogą potencjalnie znacząco wpłynąć na wyniki testu, badano początkowo w wysokich stężeniach (potrójna dawka dobową lub symulacja najgorszego przypadku) w badaniu przesiewowym w kierunku zakłóceń.

Nie stwierdzono zakłóceń dla substancji wymienionych w Tabeli 16.

**Tabela 16:** Substancje potencjalnie zakłócające

Substancja potencjalnie zakłócająca	Stężenie
Ciprofloxacin-ratiopharm® 500 mg tabletki powlekane (cyprofloksacyna)	0,375% [w/v]
Etanol	5% w przeliczeniu na eluat
Chlorowodorek guanidyny	5% w przeliczeniu na eluat
Krew ludzka	5% [v/v]
Mucyny	5% [w/v]
Kwas stearynowy/palmitynowy	40% [w/v]



## Reakcje krzyżowe

Zbadano różne organizmy (bakterie, pasożyty i wirusy), które powszechnie występują w matrycy kału. Drobnoustroje do zbadania w tym teście zostały wybrane, ponieważ albo naturalnie występują w one próbkach kału albo powodują odpowiednie objawy jako patogeny przewodu pokarmowego. Do analiz wykorzystano hodowle bakterii (od  $10^7$  do  $10^9$  CFU/mL) i grzybów lub izolaty wirusów (z dodatkich próbek kału) dla danych organizmów.

RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time PCR jest swoisty względem norowirusów GI i GII. Nie wykryto reakcji krzyżowych z następującymi gatunkami (patrz Tabela 17):

**Tabela 17:** Drobnoustroje potencjalnie reagujące krzyżowo.

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

Rotavirus	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (serotyp Enteritidis)	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (serotyp 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 Precyzja

Precyzja testu RIDA® UNITY Norovirus I & II real-time PCR została określona dla następujących poziomów.

Precyzja w obrębie oznaczenia: Oznaczenie 5 próbek kontrolnych przy użyciu 20 powtórzeń każdej z nich w systemie RIDA®UNITY w identycznych warunkach.

Precyzja pomiędzy oznaczeniami: Oznaczenie 5 próbek kontrolnych w 20 analizach w dwóch powtórzeniach w ciągu 10 dni roboczych (2 analizy dziennie) za pomocą różnych aparatów w odtwarzalnych warunkach.

Testowanie precyzji w obrębie oznaczenia i pomiędzy oznaczeniami przeprowadzono przy użyciu trzech różnych partii.

Współczynniki zmienności uzyskane dla odpowiednich pomiarów wykonanych za pomocą testu RIDA®UNITY Norovirus I & II real-time PCR wynosiły nie więcej niż 4,82% w przypadku RIDA®UNITY i nie więcej niż 3,25% w przypadku CFX96™ Dx.

**Tabela 18:** Wyniki precyzji testu RIDA®UNITY Norovirus I & II w przypadku norowirusa GI (system RIDA®UNITY)

Średnia wartość Ct/CV	W obrębie oznaczenia			Pomiędzy oznaczeniami			Pomiędzy partiami	
	Partia zestawu 1	Partia zestawu 2	Partia zestawu 3	Partia zestawu 1	Partia zestawu 2	Partia zestawu 3	Partie zestawu 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	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

**Tabela 19:** Wyniki precyzji testu RIDA®UNITY Norovirus I & II w przypadku norowirusa GI (CFX96™ Dx)

Średnia wartość Ct/CV	W obrębie oznaczenia			Pomiędzy oznaczeniami			Pomiędzy partiami	
	Partia zestawu 1	Partia zestawu 2	Partia zestawu 3	Partia zestawu 1	Partia zestawu 2	Partia zestawu 3	Partie zestawu 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	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

**Tabela 20:** Wyniki precyzji testu RIDA®UNITY Norovirus I & II w przypadku norowirusa GII (system RIDA®UNITY)

Średnia wartość Ct/CV	W obrębie oznaczenia			Pomiędzy oznaczeniami			Pomiędzy partiami	
	Partia zestawu 1	Partia zestawu 2	Partia zestawu 3	Partia zestawu 1	Partia zestawu 2	Partia zestawu 3	Partie zestawu 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	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

**Tabela 21:** Wyniki precyzji testu RIDA®UNITY Norovirus I & II w przypadku norowirusa GII (CFX96™ Dx)

Średnia wartość Ct/CV	W obrębie oznaczenia			Pomiędzy oznaczeniami			Pomiędzy partiami	
	Partia zestawu 1	Partia zestawu 2	Partia zestawu 3	Partia zestawu 1	Partia zestawu 2	Partia zestawu 3	Partie zestawu 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	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny	Wynik ujemny
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

### 13.2.4 Reaktywność analityczna

Reaktywność testu RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time RT-PCR została zbadana w zdefiniowanym panelu różnych genotypów norowirusa z genogrup I i II (patrz Tabela 22).

**Tabela 22:** Testy reaktywności analitycznej

Szczep	Wynik*	
	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	-	+

\* + = dodatni (co najmniej 2 z 3 powtórzeń dodatnie)










- = ujemny

## 14. Historia zmian

Numer wersji	Rozdział i oznaczenie
2022-08-09	Wydanie pierwsze

## 15. Objasnienia symboli

### Symbole ogólne

	Do stosowania w diagnostyce <i>in vitro</i>
	Przestrzegać instrukcji użycia
	Numer partii
	Termin ważności
	Temperatura przechowywania
	Nr kat.
	Liczba testów
	Data produkcji
	Producent

### Indywidualne symbole testów

	Mieszanina reakcyjna
	Mieszanina enzymów
	Kontrola ujemna
	Kontrola dodatnia



## 16. Piśmiennictwo

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).