

## RIDA® UNITY Norovirus I & II

**REF** UN1415



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

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



## 1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. O teste RIDA®UNITY Norovirus I & II, realizado na plataforma RIDA®UNITY, é um RT-PCR em tempo real multiplex para a detecção qualitativa direta e a diferenciação de RNA de norovirus dos genogrupos I (GI) e II (GII) em amostras de fezes humanas não tratadas de pessoas com sinais e sintomas de gastroenterite aguda.

O teste RIDA®UNITY Norovirus I & II se destina a apoiar o diagnóstico diferencial de norovirus do genogrupo I (GI) e das infecções II (GII) em pacientes com sintomas de gastroenterite em conexão com outros achados clínicos e laboratoriais.

Resultados negativos não descartam uma infecção por norovírus e não devem ser usados como única base para diagnóstico.

O produto é destinado ao uso profissional.

## 2. Sumário e explicação do teste

Os norovirus são uma das causas mais comuns de gastroenterite não bacteriana no mundo em pessoas de todas as faixas etárias e resultam em cerca de 70.000 a 200.000 mortes por ano.<sup>(1)</sup> Eles são responsáveis por cerca de 20 % de todos os casos de gastroenterite aguda em todo o mundo. Os norovirus humanos, anteriormente conhecidos como vírus Norwalk, foram identificados pela primeira vez em 1972 em amostras de fezes recolhidas durante um surto de gastroenterite em Norwalk, Ohio, EUA, tornando-os os primeiros agentes patogênicos virais que comprovadamente causam gastroenterite.<sup>(2)</sup>

Os norovirus pertencem à família *Caliciviridae* e são vírus pequenos, não desenvolvidos, com RNA (ssRNA) de cadeia simples. Com base nas sequências genéticas da RNA polimerase viral dependente do RNA e da proteína do capsídeo, os norovirus são divididos em 10 genogrupos (GI a GX) com atualmente mais de 49 genótipos diferentes (9 × GI, 27 × GII, 3 × GIII, 2 × GIV, 2 × GV, 2 × GVI e 1 genótipo cada para GVII, GVIII, GIX [anteriormente GII.15], e GX) e uma variedade de cepas. Os genogrupos I, II e, às vezes, IV são os mais importantes em termos de patogenicidade humana.<sup>(1)</sup> Nos Estados Unidos, mais de 99 % de todos os surtos de norovirus são causados por vírus GI e GII.<sup>(3)</sup> A gastroenterite por causa dos norovirus é frequentemente causada pela presença de viriões nas fezes e vômitos, enquanto que são necessárias apenas 10 partículas infecciosas para causar doenças. A alta estabilidade ambiental e a baixa dose de infecção fazem com que os norovirus sejam de alta transmissibilidade.<sup>(4)</sup> Os sintomas típicos das infecções por norovirus são diarreia, vômitos e náusea.<sup>(3)</sup>

### 3. Princípio do teste

O RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®UNITY Norovírus I & II é um teste de diagnóstico PCR molecular para a detecção direta e qualitativa e distinção do RNA do genogrupo I (GI) e do norovírus do genogrupo II (GII) e amostras de fezes humanas do RNA GIV. O processamento é totalmente automatizado com o RIDA®UNITY System. Primeiro, os ácidos nucleicos são extraídos usando o RIDA®UNITY Universal Extraction Kit e o Kit de Controle Interno. A sequência-alvo é detectada em um formato de RT-PCR em tempo real de uma etapa, ou seja, a transcrição reversa (RT) e a PCR subsequente são realizadas em um tubo de ensaio. No processo, o RNA isolado é transcrito para o cDNA com ajuda de uma transcriptase reversa. Os fragmentos de genes específicos de norovirus GI e GII/GIV são subsequentemente amplificados usando a PCR em tempo real.

As sequências-alvo amplificadas (região de junção ORF1/ORF2) são detectadas com sondas de hidrólise rotuladas com um supressor em uma extremidade e um corante de repórter fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridam com o fragmento amplificado na presença de uma sequência-alvo. Durante a extensão, a Taq polimerase separa o marcador do supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. O RIDA®UNITY Internal Control Kit deve ser usado ao mesmo tempo para que seja possível verificar a preparação da amostra e/ou a potencial inibição da PCR.

### 4. Reagentes fornecidos

Os reagentes do kit são suficientes para 96 determinações.\*

**Tab. 1:** Reagentes fornecidos

REF	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
UNZ1415RM	Reaction Mix	1 ×	1935 µL	amarelo, pronto para uso
UNZ1415EM	Enzyme Mix	1 ×	350 µL	vermelho, pronto para uso
UNZ1415PC	Positive Control	1 ×	200 µL	azul, pronto para uso
UNZ1415NC	Negative Control	1 ×	450 µL	branco, pronto para uso

\* Com o uso repetido e em séries menores, o número de reações pode ser reduzido.

## 5. Instruções de armazenamento

- Siga as orientações de manuseio da Tabela 2 e guarde o kit diretamente após a utilização, de acordo com as informações especificadas.
- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz entre -16 a -28 °C e, se não abertos, podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. A garantia de qualidade já não é válida após a data de expiração.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 - 8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetido até 8 vezes não afeta as propriedades do teste.

**Tab. 2:** Condições de armazenamento e informação

	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento
fechado	-16 a -28 °C	Pode ser usado até a data de validade impressa
aberto	-16 a -28 °C	8 ciclos de congelamento-descongelamento

## 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

O teste de RT-PCR multiplex em tempo real RIDA®UNITY Norovirus I & II destinado exclusivamente ao uso com o RIDA®UNITY System. Os seguintes produtos são absolutamente necessários para utilização correta.

### 6.1 Reagentes

Os seguintes reagentes são necessários para realizar o teste RIDA®UNITY Norovirus I & II:

Reagentes	Número do item
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

### 6.2 Equipamentos de laboratório

Os seguintes equipamentos são necessários para realizar o teste RIDA®UNITY Norovirus I & II:

Equipamentos
RIDA®UNITY System; número do item: ZUNITY (R-Biopharm AG)
Consumíveis RIDA®UNITY (pontas, placas, frascos de reação, filmes). Consultar as instruções de utilização do RIDA®UNITY System, solicitando informações sobre consumíveis.
Vortexer
Centrífuga de bancada
Luvas descartáveis sem pó
Ciclador externo (possível aperfeiçoamento do sistema)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

O kit RIDA®UNITY Norovirus I & II pode ser usado em conjunto com outros cicladores compatíveis. Os instrumentos alternativos de PCR em tempo real devem ser verificados/validados pelo usuário. Por favor contate a R-Biopharm AG em [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de) para verificar a compatibilidade.

## 7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Para diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório qualificado. Devem ser observadas as diretrizes para trabalho em laboratórios médicos.

Sempre cumpra estritamente as instruções de uso para a realização desse teste.

Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.

Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.

Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas. Evite contaminar as amostras e componentes do kit com micróbios e nucleases (DNase/RNase).

As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.

Não substitua ou combine os componentes (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) de um lote de um kit com os componentes de outro lote.

O kit de teste pode ser usado por 8 semanas após a primeira abertura (o kit pode ser recarregado até 6 vezes). Não use o kit de teste após o prazo de validade. Estas especificações também são verificadas pelo RIDA®UNITY System.

Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

Mais detalhes sobre as Folhas de Dados de Segurança (Safety Data Sheets, SDS) podem ser encontrados sob o número do item em <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para usuários na União Europeia: Comunicar todos os eventos adversos graves associados ao produto à R-Biopharm AG e às autoridades nacionais competentes.

## 8. Coleta e armazenamento de amostras

Recomenda-se o uso de material de amostra fresca para obter o melhor desempenho do ensaio RIDA®UNITY Norovirus I & II.

Evite congelar e descongelar repetidamente a amostra.

Não colete as amostras de fezes em recipientes de transporte que contenham meios de transporte com conservantes, soros animais, íons metálicos, agentes oxidantes ou detergentes, pois tais substâncias podem interferir com os testes RIDA®UNITY.

Recomenda-se produzir alíquotas das amostras para evitar o descongelamento e o congelamento repetidos. As amostras congeladas devem ser descongeladas imediatamente antes da extração para evitar a degradação dos ácidos nucleicos.

Siga as instruções de armazenamento das amostras nas Tabelas 3 a 6.

**Tab. 3:** Armazenamento de amostras - Detecção de norovirus GI

Amostras nativas - fezes		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 / -80 °C
≤ 7 dias	≤ 9 dias	≤ 6 meses

Em eluato (a partir de fezes)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 1 mês

Em uma temperatura de armazenamento de -20 / -80 °C, o congelamento/descongelamento repetido da amostra de fezes até 5 vezes não afeta as propriedades do teste.

Em uma temperatura de armazenamento de -20 °C, o congelamento/descongelamento repetido do eluato (a partir de fezes) até 3 vezes não afeta as propriedades do teste.

**Tab. 4:** Armazenamento de amostras - Detecção de norovirus GII

Amostras nativas - fezes		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 / -80 °C
≤ 7 dias	≤ 9 dias	≤ 6 meses

Em eluato (a partir de fezes)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 1 mês

Em uma temperatura de armazenamento de -20 / -80 °C, o congelamento/descongelamento repetido da amostra de fezes até 5 vezes não afeta as propriedades do teste.

Em uma temperatura de armazenamento de -20 °C, o congelamento/descongelamento repetido do eluato (a partir de fezes) até 3 vezes não afeta as propriedades do teste.

### **8.1 Preparação de DNA a partir de amostras de fezes**

Para isolar o DNA das amostras de fezes, use o RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Siga os procedimentos corretos de uso das instruções de utilização do RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (Seção: Preparação de ácido nucleico a partir de amostras de fezes).

## **9. Realização do teste**

Tanto as amostras como os reagentes do RIDA®UNITY Norovirus I & II são colocados no RIDA®UNITY System no início do uso.

Antes, misture adequadamente a **Reaction Mix**, **Negative Control** e **Positive Control** usando um agitador vortex. Não agite a **Enzyme Mix**. Em seguida, centrifugue brevemente todos os componentes.

Os tubos de PCR das amostras a serem examinadas devem ser posicionados antecipadamente no ciclador de PCR integrado.

Os processadores estão configurados para carregar corretamente o sistema com reagentes e consumíveis. Para o processo de abastecimento, siga as instruções do RIDA®UNITY System. Observe as seções relevantes no manual do RIDA®UNITY System (Seção: Realização da execução).

O teste RIDA®UNITY Norovirus I & II apenas pode ser usado em combinação com o RIDA®UNITY Internal Control Kit. Isto permite o reconhecimento antecipado da potencial inibição da PCR, verificação da integridade do reagente e confirmação da extração bem-sucedida do ácido nucleico. O procedimento está descrito nas instruções de utilização do RIDA®UNITY Internal Control Kit (Seção: Realização do teste).

O processamento automatizado é descrito no manual do RIDA®UNITY System (Seção: Realização da execução).

## 9.1 Configurações do dispositivo

### 9.1.1 Perfil de PCR em tempo real universal

Para harmonizar os ensaios RIDA®UNITY, o ensaio RIDA®UNITY Norovirus I & II foi verificado exclusivamente no perfil universal. Isto torna possível combinar os ensaios de DNA e RNA um com o outro. De maneira geral, a transcrição reversa, portanto, vem em primeiro lugar no perfil universal.

**Tab. 7:** Perfil de PCR em tempo real universal para o RIDA®UNITY

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Tempo máximo

**Nota:** O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

**Tab. 8:** Perfil de PCR em tempo real universal para o CFX96™ Dx

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Tempo máximo

**Nota:** O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

## 9.2 Configuração do canal de detecção

**Tab. 9:** Seleção dos canais de detecção adequados

<b>Instrumento de PCR em tempo real</b>	<b>Deteccção</b>	<b>Canal de deteccção</b>	<b>Indicação</b>
<b>R-Biopharm RIDA®UNITY</b>	Norovirus GII	FAM	SEEK channel GGII
	Controle Interno	HEX	SEEK channel ICD
	Norovirus GI	Cy5	SEEK channel GGI
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	Norovirus GII	FAM	SEEK channel GGII
	Controle Interno	VIC	SEEK channel ICD
	Norovirus GI	Cy5	SEEK channel GGI

## 10. Controle de qualidade - indicação de instabilidade ou expiração de reagentes

As amostras são avaliadas usando o software analítico RIDA®SEEK do RIDA®UNITY System. O **Negative Control** e o **Positive Control** devem mostrar os resultados corretos (ver Tab. 9).

O **Positive Control** está presente em uma concentração de  $10^3$  cópias/ $\mu$ L. É usado em uma quantidade total de  $5 \times 10^3$  cópias em cada execução de PCR.

O **Negative Control** já contém o RIDA®UNITY Internal Control. Uma vez que os controles não contêm um modelo, nenhum sinal deve ser antecipado nos canais-alvo. Os sinais positivos no canal IC com o qual o controle interno é detectado são essenciais (ver Tab. 10).

**Tab.10:** Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

Amostra	Resultado	IC Ct	Gene-alvo Ct
Controle positivo	+	N/D*	Ver Certificado de Análise (Certificado de Análise, CoA)
Controle negativo	-	Ct > 20	0

\*Em determinadas circunstâncias, o canal IC pode ter um sinal positivo no controle positivo e, portanto, não deve ser avaliado.

Se o controle positivo não estiver dentro da faixa Ct especificada, mas o controle negativo for válido, todas as reações, incluindo os controles, precisam ser reanalisadas na PCR.

Se o controle negativo não for negativo, mas o controle positivo for válido, todas as reações, incluindo os controles, precisam ser reanalisadas na PCR.

Se os valores especificados não forem atingidos, verifique os seguintes itens antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo utilizado
- Execução correta do teste

Se as condições ainda não forem cumpridas após repetir o teste, consulte o fabricante ou seu distribuidor local R-Biopharm.

## 11. Avaliação e interpretação

A avaliação e interpretação das amostras são feitas usando o software analítico RIDA®UNITY System, RIDA®SEEK.

Não existe atualmente nenhum método de referência ou material de referência reconhecido internacionalmente para padronização. Os materiais de controle são rastreáveis metrologicamente até o padrão interno da R-Biopharm AG com base em fragmentos amplificados específicos e sintéticos de RNA.

Para obter mais informações sobre rastreabilidade metrológica, entre em contato com a R-Biopharm AG.

Os valores especificados, intervalos e outros detalhes podem ser encontrados no Certificado de Análise (Certificate of Analysis, CoA) anexo.

**Tab.11:** Interpretação dos resultados\*

Detecção de			
Norovirus GII	Norovirus GI	IC	Resultado
+	-	+/-	Norovirus GI/GII <sup>1</sup> detectável
-	+	+/-	Norovirus GI detectável
+	+	+/-	Norovirus GII <sup>1</sup> e norovirus GI detectável
-	-	+	Genes alvo não detectáveis
-	-	-	Inválido

\*+ = positivo

- = negativo

<sup>1</sup> Ver Limitações do método (Secção 10).

Uma amostra é positiva se o RNA da amostra e o **Internal Control** mostrarem um sinal de amplificação no sistema de detecção.

A amostra também é positiva se o RNA da amostra mostrar um sinal de amplificação, mas nenhum sinal de amplificação puder ser visto para o **Internal Control** no sistema de detecção. A detecção do **Internal Control** não é necessária neste caso, porque as altas concentrações de fragmentos amplificados podem causar um sinal fraco ou ausente do **Internal Control**.

Uma amostra é negativa se o RNA da amostra não mostrar um sinal de amplificação, mas um sinal de amplificação for visível para o **Internal Control** no sistema de detecção. A inibição da reação de PCR e a extração antecipada pode ser excluída através da detecção do **Internal Control**.

Uma amostra é inválida se o RNA da amostra e o **Internal Control** não mostrarem um sinal de amplificação no sistema de detecção. Existem inibidores na amostra ou ocorreu um erro durante o processo de extração.

## 12. Limitações do método

1. O teste RIDA®UNITY Norovirus I & II detecta RNA de norovirus GI GII em amostras de fezes humanas não tratadas. Uma conexão entre o nível do valor Ct determinado e a ocorrência de sintomas clínicos graves não pode ser derivada disso. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com os sintomas clínicos como um todo.
2. O diagnóstico não deve ser baseado apenas no resultado da análise biológica molecular, mas deve sempre levar em conta a história médica e os sintomas do paciente.
3. Este teste somente é aprovado para processamento automatizado usando o RIDA®UNITY System.
4. Este teste somente é verificado e validado para amostras de fezes.
5. Amostragem, transporte, armazenamento e manuseio inadequado de amostras ou carga de patógenos abaixo da sensibilidade analítica do teste podem levar a resultados falso-negativos.
6. A presença de inibidores de PCR pode levar a resultados falsos negativos ou inválidos.
7. Como em todos os testes de diagnóstico *in vitro* baseados em PCR, concentrações extremamente baixas das sequências-alvo que estão abaixo do limite de detecção (LoD 95 %) podem ser detectadas. Os resultados obtidos nem sempre são reproduzíveis.
8. Mutações ou polimorfismos nos locais de ligação do iniciador ou da sonda podem interferir na detecção de variantes novas ou desconhecidas e podem levar a resultados falsos-negativos usando o RIDA®UNITY Norovirus I & II.
9. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Um resultado positivo indica que os genes alvo (norovirus GI e norovirus GII, região de junção ORF1/ORF2) estão presentes.
10. Norovírus do genogrupo IV que, em casos muito raros, também podem infectar seres humanos, são igualmente detectados usando o RIDA®UNITY Norovirus I & II.
11. Este ensaio deve ser realizado em conformidade com o regulamento sobre Boas Práticas Laboratoriais (BPL). Os usuários devem seguir as instruções do fabricante com precisão ao realizar o teste.

### 13. Características de desempenho

#### 13.1 Características de desempenho clínico

O PCR em tempo real multiplex RIDA®UNITY Norovirus I & II foi comparado em um laboratório externo com um teste de referência com a marca CE baseado em 237 amostras de fezes de pacientes com sintomas de infecção gastrointestinal.

Os resultados mostram uma elevada sensibilidade e especificidade para a detecção de norovirus GI ou GII em amostras de fezes humanas.

**Tab. 12:** Detecção de norovirus GI

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

Sensibilidade relativa (IC 95 %)	91,7 % (77,5 % - 98,2 %)
Especificidade relativa (IC 95 %)	100 % (98,2 % - 100 %)

**Tab. 13:** Detecção de norovirus GII

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

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

## 13.2 Características de desempenho clínico

### 13.2.1 Limite de detecção (LoD 95%)

Uma amostra positiva (conjunto de amostras negativas, fortificadas com amostras de conjuntos clínicos positivos) foi medida em cinco etapas de diluição (em etapas de 0,25-log) para cada alvo com 20 réplicas por etapa em um lote para determinar o LoD. Isto foi seguido por uma análise de probit. Em seguida, o LoD calculado foi confirmado com 20 réplicas por alvo para a etapa/concentração da diluição calculada.

Para a detecção de RNA de norovirus GI e norovirus GII utilizando o ensaio RIDA®UNITY Norovirus I & II, o UNITY System, foram identificados os seguintes limites de detecção (LoD).

Os resultados dessas medições são mostrados na Tabela 15.

**Tab. 15:** Resultados do limite de detecção do teste RIDA®UNITY Norovirus I & II para os parâmetros de norovirus GI e norovirus GII em amostras de fezes.

	Norovirus GI	Norovirus GII
LDD	4.85E-04 [fator de diluição]**	5.98E-05 [fator de diluição]*

(\*) Diluição relativa da concentração de estoque. Amostra clínica positiva com faixa Ct de 26 - 27

(\*\*) Diluição relativa da concentração de estoque. Amostra clínica positiva com faixa Ct de 30 - 31

O LoD para o parâmetro de norovirus GI em amostras de fezes foi determinado como 4.85E-04 [fator de diluição].

O LoD para o parâmetro de norovirus GII em amostras de fezes foi determinado como 5.98E-05 [fator de diluição].

Para o fluxo de trabalho aprimorado usando o CFX96™ Dx, esses valores de LoD foram confirmados sob a suposição de que nos mantemos em uma faixa de LoD de 2--3 vezes.

### 13.2.2 Especificidade analítica

#### Substâncias interferentes

A presença de inibidores de PCR e de substâncias interferentes pode levar a resultados falso-negativos ou inválidos. Portanto, foram investigados os efeitos de várias substâncias que podem existir devido ao seu amplo uso para infecções gastrointestinais ou ocorrência generalizada nas amostras correspondentes. As substâncias que poderiam potencialmente influenciar significativamente os resultados do teste foram examinadas inicialmente em altas concentrações (o triplo da dose diária ou simulação do pior caso) em uma tela de interferência. Não foi encontrada nenhuma interferência para as substâncias listadas na Tabela 16.

**Tab. 16:** Substâncias potencialmente interferentes

Substância potencialmente interferente	Concentração
Comprimidos revestidos por película de Ciprofloxacina-ratiopharm® 500 mg (ciprofloxacina)	0,375 % (p/v)
Etanol	5 % com base no eluato
Cloreto de guanidínio	5 % com base no eluato
Sangue humano	5 % [v/v]
Mucina	5 % (p/v)
Ácido palmítico/esteárico	40 % (p/v)

## Reações cruzadas

Foram investigados vários organismos (bactérias, parasitas e vírus) que podem ser encontrados comumente na matriz das fezes. Os micro-organismos a serem investigados para este ensaio foram escolhidos porque ou eles ocorrem naturalmente em amostras de fezes, ou causam sintomas correspondentes como patógenos gastrointestinais. Foram utilizados para análise culturas bacterianas (entre  $10^7$  e  $10^9$  UFC/mL) e culturas fúngicas ou isolados virais (de amostras de fezes positivas) dos respectivos organismos.

O PCR em tempo real multiplex RIDA<sup>®</sup>UNITY Norovirus I & II é específico para norovirus GI e norovirus GII. Não foram detectadas reatividades cruzadas para as seguintes espécies (consulte a Tab. 17):

**Tab. 17:** Organismos potencialmente reativos cruzados

Organismo	Resultado do teste*	
	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> (sorotipo Enteritidis)	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (sorotipo 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 Precisão

A precisão do teste PCR em tempo real RIDA®UNITY Norovirus I & II foi determinada para os seguintes níveis de consideração.

Precisão *Intraensaio*: Determinação de 5 amostras de controle usando 20 réplicas cada uma no RIDA®UNITY sob condições idênticas.

Precisão *Interensaio*: Determinação de 5 amostras de controle em 20 execuções em duplicado em 10 dias de trabalho (2 execuções por dia) realizadas em instrumentos diferentes em condições reprodutíveis.

Os testes de precisão *intra* e *interensaio* foram realizados utilizando três lotes diferentes.

Os coeficientes de variação obtidos das respectivas medições realizadas utilizando o teste PCR em tempo real RIDA®UNITY Norovirus I & II não foram superiores a 4,82 % no RIDA®UNITY e não mais de 3,25 % no CFX96™ Dx.

**Tab. 18:** Resultados da precisão do teste RIDA®UNITY Norovirus I & II para norovirus GI (RIDA®UNITY System)

Valor médio	Ct/CV	<i>Intraensaio</i>			<i>Interensaio</i>			<i>Interlote</i>
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do 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 (%)	/	/	/	/	/	/	/

**Tab. 19:** Resultados da precisão do teste RIDA®UNITY Norovirus I & II para norovirus GI (CFX96™ Dx)

Valor médio Ct/CV	Intraensaio			Interensaio			Interlote	
	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do 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 (%)	/	/	/	/	/	/	/

**Tab. 20:** Resultados da precisão do teste RIDA®UNITY Norovirus I & II para norovirus GII (RIDA®UNITY System)

Valor médio Ct/CV	<i>Intraensaio</i>			<i>Interensaio</i>			<i>Interlote</i>	
	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do 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 (%)	/	/	/	/	/	/	/

**Tab. 21:** Resultados da precisão do teste RIDA®UNITY Norovirus I & II para norovirus GII (CFX96™ Dx).

Valor médio Ct/CV	Intraensaio			Interensaio			Interlote	
	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do 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 Reatividade analítica

A reatividade do teste RT-PCR multiplex em tempo real RIDA®UNITY Norovirus I & II foi avaliada em um painel definido dos vários genótipos de norovirus dos genogrupos I e II (consulte a Tab. 22).

**Tab. 22:** Testes de reatividade analítica

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

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

- = negativo

## 14. Histórico de versões

Número da versão	Seção e designação
2022-08-09	Versão da edição

## 15. Explicação dos símbolos

### Símbolos gerais

	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Siga as instruções de uso
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de armazenamento
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

### Símbolos específicos do teste

	Mistura de reação
	Mistura de enzimas
	Controle negativo
	Controle positivo

## 16. Referências

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).