

RIDA® UNITY Norovirus I & II

REF UN1415



1. Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie *in vitro*. Test RIDA®UNITY Norovirus I & II, ktorý sa vykonáva na platforme RIDA® UNITY, je multiplexný test RT-PCR v reálnom čase na priamu kvalitatívnu detekciu a diferenciaciu RNA norovírusov génovej skupiny I (GI) a II (GII) v neliečených vzorkách ľudskej stolice od ľudí s prejavmi a príznakmi akútnej gastroenteritídy.

Test RIDA®UNITY Norovirus I & II je určený na podporu diferenciálnej diagnostiky infekcií norovírusmi génovej skupiny I (GI) a II (GII) u pacientov s príznakmi gastroenteritídy v spojení s ďalšími klinickými a laboratórnymi nálezmi.

Negatívne výsledky nevyklučujú infekciu norovírusom a nemajú sa používať ako jediný základ diagnostiky.

Produkt je určený na profesionálne použitie.

2. Zhrnutie a vysvetlenie testu

Norovírusy sú jednou z najčastejších príčin nebakteriálnej gastroenteritídy u ľudí všetkých vekových kategórií vo svete a spôsobujú približne 70 000 až 200 000 úmrtí každý rok.⁽¹⁾ Sú zodpovedné za približne 20 % všetkých prípadov akútnej gastroenteritídy celosvetovo. Ľudské norovírusy, predtým známe ako vírusy Norwalk, boli prvýkrát identifikované v roku 1972 vo vzorkách stolice odobraných počas vypuknutia gastroenteritídy v meste Norwalk, Ohio, USA, čo ich robí prvými vírusovými patogénmi, u ktorých bolo preukázané, že spôsobujú gastroenteritídu.⁽²⁾ Norovírusy patria do čeľade *Caliciviridae* a sú to malé neobalené vírusy s jednoreťazcovou RNA (ssRNA). Na základe genetických sekvencií vírusovej RNA polymerázy závislej od RNA a kapsidového proteínu sa norovírusy rozdeľujú do 10 génových skupín (GI až GX) s viac ako 49 v súčasnosti známymi rôznymi genotypmi (9 × GI, 27 × GII, 3 × GIII, 2 × GIV, 2 × GV, 2 × GVI a 1 genotyp pre každý GVII, GVIII, GIX [pôvodne GII.15] a GX) a rôznymi kmeňmi. Z hľadiska ľudskej patogenity sú najdôležitejšie génové skupiny I, II a niekedy IV.⁽¹⁾ V Spojených štátoch je viac než 99 % vypuknutí norovírusov spôsobených vírusmi GI a GII.⁽³⁾ Gastroenteritída z dôvodu norovírusov je často spôsobená prítomnosťou viriónov v stolici a zvratkoch, pričom stačí len 10 infekčných častíc na vyvolanie ochorenia. Vysoká environmentálna stabilita a nízka infekčná dávka sú príčinou vysokej prenosnosti norovírusu.⁽⁴⁾ Typickými príznakmi norovírusových infekcií sú hnačka, vracanie a nevoľnosť.⁽³⁾

3. Princíp testu

Multiplexný test RT-PCR v reálnom čase RIDA®UNITY Norovirus I & II je molekulárne diagnostická PCR na priamu kvalitatívnu detekciu a diferenciáciu RNA norovírusu genoskupiny I (GI) a RNA norovírusu genoskupiny II (GII) a GIV vo vzorkách ľudskej stolice. Spracovanie je plne automatizované v systéme RIDA®UNITY System. Najprv dochádza k extrakcii nukleových kyselín pomocou súpravy RIDA®UNITY Universal Extraction Kit a súpravy Internal Control Kit. Cieľová sekvencia sa deteguje v jedнокrokovom formáte RT-PCR v reálnom čase, čo znamená, že reverzná transkripcia (RT) a následná PCR prebiehajú v jednej reakčnej liekovke. V tomto procese sa izolovaná RNA prepisuje pomocou reverznej transkriptázy do cDNA. Génové fragmenty špecifické pre norovírus GI a GIIGIV sa potom namnožia pomocou PCR v reálnom čase.

Namnožené cieľové sekvencie (spojovacia oblasť ORF1/ORF2) sa detegujú pomocou hydrolyzných sond označených zhášadlom na jednom konci a fluorescenčným reportérovým farbivom (fluorofórom) na druhom konci. SONDY hybridizujú s amplicónom v prítomnosti cieľovej sekvencie. Počas predlžovania oddeľuje polymeráza Taq Polymerase reportér od zhášadla. Reportér vysiela fluorescenčný signál, ktorý je detegovaný optickou jednotkou prístroja PCR v reálnom čase. Fluorescenčný signál narastá s množstvom vytvorených amplicónov. Súpravu RIDA®UNITY Internal Control Kit je potrebné použiť v rovnakom čase, aby bolo možné kontrolovať prípravu vzorky a/alebo potenciálnu inhibíciu PCR.

4. Dodané činidlá

Činidlá v súprave postačujú na 96 stanovení.*

Tab. 1: Dodané činidlá

REF	Činidlo	Množstvo		Farba veka
UNZ1415RM	Reaction Mix	1 ×	1935 µL	žltá, pripravené na použitie
UNZ1415EM	Enzyme Mix	1 ×	350 µL	červená, pripravené na použitie
UNZ1415PC	Positive Control	1 ×	200 µL	modrá, pripravené na použitie
UNZ1415NC	Negative Control	1 ×	450 µL	biela, pripravené na použitie

* Pri opakovanom používaní a v menších sériách môže byť počet reakcií nižší.

5. Pokyny na skladovanie

- Postupujte podľa pokynov na manipuláciu v tabuľke 2 a súpravu uskladnite priamo po použití podľa uvedených informácií.
- Všetky činidlá sa musia uchovávať mimo dosahu svetla pri teplote -16 až -28 °C a ak nie sú otvorené, môžu sa používať do dátumu expirácie vytlačeného na štítku. Záruka kvality prestáva platiť po uplynutí dátumu expirácie.
- Všetky činidlá sa musia pred použitím opatrne rozmraziť (napr. v chladničke pri teplote 2 - 8 °C).
- Opakované zmrazovanie a rozmrazovanie až 8-krát nemá vplyv na vlastnosti testu.

Tab. 2: Podmienky skladovania a informácie

	Teplota skladovania	Maximálny čas skladovania
neotvorené	-16 až -28 °C	Možno použiť do vytlačeného dátumu expirácie
otvorené	-16 až -28 °C	8 cyklov zmrazenia a rozmrazenia

6. Činidlá, ktoré sa vyžadujú, ale nie sú súčasťou dodávky

Multiplexný RT-PCR test v reálnom čase RIDA®UNITY Norovirus I & II je určený výlučne na použitie so systémom RIDA®UNITY System. Na správne používanie sú bezpodmienečne potrebné nasledujúce produkty:

6.1 Činidlá

Na vykonanie testu RIDA®UNITY Norovirus I & II sú potrebné nasledujúce činidlá:

Činidlá	Číslo položky
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Laboratórne vybavenie

Na vykonanie testu RIDA®UNITY Norovirus I & II je potrebné nasledujúce vybavenie:

Vybavenie
Systém RIDA®UNITY System; číslo položky: ZUNITY (R-Biopharm AG)
Spotrebný materiál RIDA®UNITY (špičky, doštičky, reakčné liekovky, filmy). Informácie o objednávaní spotrebného materiálu nájdete v návode na použitie systému RIDA®UNITY System.
Vortex
Stolná centrifúga
Jednorazové rukavice bez prášku
Externý cyklér (možné vylepšenie systému)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Súpravu RIDA®UNITY Norovirus I & II možno použiť v kombinácii s inými kompatibilnými cyklérmi. Alternatívne prístroje na PCR v reálnom čase musí overiť/potvrdiť používateľ. Na overenie kompatibility kontaktujte spoločnosť R-Biopharm AG na e-mailovej adrese pcr@r-biopharm.de.

7. Varovania a bezpečnostné opatrenia pre používateľov

Na diagnostické použitie *in vitro*.

Tento test smie vykonávať iba kvalifikovaný laboratórny personál. Musia sa dodržiavať usmernenia pre prácu v zdravotníckych laboratóriách.

Pri vykonávaní tohto testu vždy prísne dodržiavajte návod na použitie.

Nepipetujte vzorky ani činidlá ústami. Zabráňte kontaktu s porušenou pokožkou a sliznicami.

Pri manipulácii s činidlami a vzorkami noste osobné ochranné prostriedky (vhodné rukavice, laboratórny plášť, ochranné okuliare) a po dokončení testu si umyte ruky.

V priestoroch, kde sa manipuluje so vzorkami, nefajčite, nejedzte ani nepite.

Zabráňte kontaminácii vzoriek a súčastí súpravy mikróbmami a nukleázami (DNáza/RNáza).

Klinické vzorky sa musia považovať za potenciálne infekčné a musia sa náležite zlikvidovať, rovnako ako všetky činidlá a materiály, ktoré prichádzajú do kontaktu s potenciálne infekčnými vzorkami.

Nevymieňajte ani nezmiešavajte súčasti (Reaction Mix, Enzyme Mix,

Positive Control, Negative Control) jednej šarže súpravy so súčasťami inej šarže.

Testovaciu súpravu je možné používať 8 týždňov po prvom otvorení (súpravu možno opätovne použiť až 6-krát). Nepoužívajte testovaciu súpravu po dátume expirácie.

Tieto špecifikácie kontroluje aj systém RIDA®UNITY System.

Používatelia sú zodpovední za správnu likvidáciu všetkých činidiel a materiálov po použití. Pri likvidácii dodržiavajte národné nariadenia.

Ďalšie podrobnosti o karte bezpečnostných údajov (Safety Data Sheet, SDS) nájdete pod číslom položky na stránke <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Pre používateľov v Európskej únii: Všetky závažné nežiaduce udalosti spojené s produktom nahláste spoločnosti R-Biopharm AG a príslušným národným úradom.

8. Odber a skladovanie vzoriek

Na dosiahnutie najlepšieho výkonu testu RIDA[®]UNITY Norovirus I & II sa odporúča používať čerstvé vzorky materiálu.

Vyhňte sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu vzorky.

Vzorky stolice neodoberajte do prepravných nádob, ktoré obsahujú transportné médiá s konzervačnými prostriedkami, zvieracie séra, kovové ióny, oxidačné činidlá alebo detergenty, pretože takéto látky môžu interferovať s testami RIDA[®]UNITY.

Aby sa zabránilo opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu, odporúča sa pripraviť alikvótne časti vzoriek. Zmrazené vzorky sa majú rozmraziť bezprostredne pred extrakciou, čím sa zabráni degradácii nukleových kyselín.

Postupujte podľa pokynov na skladovanie vzoriek v tabuľkách 3 až 6.

Tab. 3: Skladovanie vzorky - detekcia norovírusu GI

Natívne vzorky - stolica		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20/-80 °C
≤ 7 dní	≤ 9 dní	≤ 6 mesiacov

V eluáte (zo stolice)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 hodín	≤ 36 hodín	≤ 1 mesiac

Pri teplote skladovania -20/-80 °C nemá opakované zmrazovanie/rozmrazovanie vzorky stolice až 5-krát vplyv na vlastnosti testu.

Pri teplote skladovania -20 °C nemá opakované zmrazovanie/rozmrazovanie eluátu (zo stolice) až 3-krát vplyv na vlastnosti testu.

Tab. 4: Skladovanie vzorky - detekcia norovírusu GII

Natívne vzorky - stolica		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20/-80 °C
≤ 7 dní	≤ 9 dní	≤ 6 mesiacov

V eluáte (zo stolice)		
30 °C	2 - 8 °C	-20 °C
≤ 24 hodín	≤ 36 hodín	≤ 1 mesiac

Pri teplote skladovania -20/-80 °C nemá opakované zmrazovanie/rozmrazovanie vzorky stolice až 5-krát vplyv na vlastnosti testu.

Pri teplote skladovania -20 °C nemá opakované zmrazovanie/rozmrazovanie eluátu (zo stolice) až 3-krát vplyv na vlastnosti testu.

8.1 Príprava DNA zo vzoriek stolice

Na izoláciu DNA zo vzoriek stolice použite súpravu RIDA®UNITY Universal Extraction Kit. Postupujte podľa správnych postupov uvedených v návode na použitie súpravy RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (časť: Príprava nukleových kyselín zo vzoriek stolice).

9. Postup testovania

Na začiatku používania umiestnite vzorky aj činidlá súpravy RIDA®UNITY Norovirus I & II do systému RIDA®UNITY System.

Pred použitím dostatočne premiešajte činidlá **Reaction Mix**, **Negative Control** a **Positive Control** vo vortexe. Enzymovú zmes **Enzyme Mix** nepremiešavajte vo vortexe. Potom všetky súčasti krátko centrifugujte.

Skúmavky na PCR na vzorky sa musia vopred umiestniť do integrovaného PCR cykléra.

Na správne vloženie činidiel a spotrebného materiálu do systému sú k dispozícii nosiče. Počas vkladania postupujte podľa pokynov pre systém RIDA®UNITY System. Dodržiavajte príslušné časti príručky k systému RIDA®UNITY System (časť: Vykonanie cyklu).

Test RIDA®UNITY Norovirus I & II sa môže používať len v kombinácii so súpravou RIDA®UNITY Internal Control Kit. To umožňuje včasné rozpoznanie potenciálnej inhibície PCR, overenie integrity činidla a potvrdenie úspešnej extrakcie nukleových kyselín. Postup je opísaný v návode na použitie súpravy RIDA®UNITY Internal Control Kit (časť: Postup testovania).

Automatizované spracovanie je opísané v príručke k systému RIDA®UNITY System (časť: Vykonanie cyklu).

9.1 Nastavenia zariadenia

9.1.1 Univerzálny profil PCR v reálnom čase

Na harmonizáciu analýz RIDA®UNITY bola analýza RIDA®UNITY Norovirus I & II overená v univerzálnom profile. To umožňuje navzájom kombinovať testy DNA a RNA. Vo všeobecnosti je preto reverzná transkripcia v univerzálnom profile na prvom mieste.

Tab. 7: Univerzálny PCR profil v reálnom čase pre RIDA®UNITY

<u>Reverzná transkripcia</u>	10 min, 58 °C
Úvodná denaturácia	1 min, 95 °C
Cykly	45 cyklov
<u>PCR</u> denaturácia	10 s, 95 °C
Žíhanie/predlžovanie	15 s, 60 °C
Rýchlosť prechodu teploty/ rýchlosť zahrievania	Maximálna

Poznámka: Žíhanie a predlžovanie prebieha v rovnakom kroku.

Tab. 8: Univerzálny profil PCR v reálnom čase pre systém CFX96™ Dx

<u>Reverzná transkripcia</u>	10 min, 58 °C
Úvodná denaturácia	1 min, 95 °C
Cykly	45 cyklov
<u>PCR</u> denaturácia	15 s, 95 °C
Žíhanie/predlžovanie	30 s, 60 °C
Rýchlosť prechodu teploty/ rýchlosť zahrievania	Maximálna

Poznámka: Žíhanie a predlžovanie prebieha v rovnakom kroku.

9.2 Nastavenie detekčného kanála

Tab. 9: Výber vhodných detekčných kanálov

Prístroj PCR v reálnom čase	Detekcia	Detekčný kanál	Poznámka
R-Biopharm RIDA®UNITY	Norovírus GII	FAM	SEEK kanál GGII
	Vnútoraná kontrola	HEX	SEEK kanál ICD
	Norovírus GI	Cy5	SEEK kanál GGI
Bio-Rad CFX96™ Dx	Norovírus GII	FAM	SEEK kanál GGII
	Vnútoraná kontrola	VIC	SEEK kanál ICD
	Norovírus GI	Cy5	SEEK kanál GGI

10. Kontrola kvality - indikácia nestability alebo exspirácie činidiel

Vzorky sa vyhodnocujú pomocou analytického softvéru RIDA®SEEK systému RIDA®UNITY System. Kontroly **Negative Control** a **Positive Control** musia vykazovať správne výsledky (pozrite si tabuľku 9).

Kontrola **Positive Control** je k dispozícii v koncentrácii 10^3 kópií/ μ L. Používa sa v celkovom množstve 5×10^3 kópií v každom spracovaní PCR.

Negatívna kontrola **Negative Control** už obsahuje vnútornú kontrolu RIDA®UNITY Internal Control. Keďže kontroly neobsahujú šablónu, v cieľových kanáloch sa neočakávajú žiadne signály. Pozitívne signály v kanáli IC, v ktorom je detegovaná vnútorná kontrola, sú kľúčové (pozrite si tabuľku 10).

Tabuľka 10: Platné spracovanie PCR musí spĺňať nasledujúce podmienky:

Vzorka	Výsledok	IC Ct	Cieľový gén Ct
Pozitívna kontrola	+	Nedostupné*	Pozrite si certifikát analýzy (Certificate of Analysis, CoA)
Negatívna kontrola	-	Ct > 20	0

* Za určitých okolností môže mať kanál IC pozitívny signál v pozitívnej kontrole a preto sa nesmie vyhodnocovať.

Ak pozitívna kontrola nie je v rámci špecifikovaného rozsahu Ct, ale negatívna kontrola je platná, všetky reakcie vrátane kontrol je potrebné znova analyzovať v PCR.

Ak negatívna kontrola nie je negatívna, ale pozitívna kontrola je platná, všetky reakcie vrátane kontrol je potrebné znova analyzovať v PCR.

Ak nie sú splnené špecifikované hodnoty, pred opakovaním testu skontrolujte nasledujúce položky:

- Dátum exspirácie použitých činidiel
- Funkčnosť používaného vybavenia
- Správny postup testovania

Ak podmienky nie sú splnené ani po opakovaní testu, obráťte sa na výrobcu alebo miestneho distribútora spoločnosti R-Biopharm.

11. Hodnotenie a interpretácia

Hodnotenie a interpretácia vzoriek sa vykonávajú pomocou analytického softvéru systému RIDA®UNITY System - RIDA®SEEK.

V súčasnosti neexistuje medzinárodne uznávaná referenčná metóda ani referenčný materiál na štandardizáciu. Kontrolné materiály možno metrologicky vysledovať k interným štandardom spoločnosti R-Biopharm AG na základe špecifických syntetických amplikónov RNA.

Ak potrebujete ďalšie informácie o metrologickej sledovateľnosti, obráťte sa na spoločnosť R-Biopharm AG.

Špecifikované hodnoty, rozsahy a ďalšie podrobnosti nájdete v certifikáte analýzy (Certificate of Analysis, CoA).

Tabuľka 11: Interpretácia výsledkov*

Detekcia druhu			
Norovírus GII	Norovírus GI	IC	Výsledok
+	-	+/-	Norovírus GII ¹ je detegovateľný
-	+	+/-	Norovírus GI je detegovateľný
+	+	+/-	Norovírus GII ¹ a norovírus GI sú detegovateľné
-	-	+	Cieľové gény nie sú detegovateľné
-	-	-	Neplatný

*+ = pozitívne

- = negatívne

¹ Pozrite si Limitácie metódy (časť 10).

Vzorka je pozitívna, ak RNA vzorky a kontrola **Internal Control** vykazujú amplifikačný signál v detekčnom systéme.

Vzorka sa považuje za pozitívnu aj vtedy, ak RNA vzorky vykazuje amplifikačný signál, ale v detekčnom systéme nie je možné vidieť žiadny amplifikačný signál pre kontrolu **Internal Control**. V tomto prípade sa nevyžaduje detekcia kontroly **Internal Control**, keďže vysoké koncentrácie amplikónov môžu spôsobiť slabý alebo chýbajúci signál kontroly **Internal Control**.

Vzorka je negatívna, ak RNA vzorky nevykazuje amplifikačný signál, ale v detekčnom systéme je viditeľný amplifikačný signál pre kontrolu **Internal Control**. Inhibíciu reakcie PCR a predchádzajúcu extrakciu možno vylúčiť prostredníctvom detekcie kontroly **Internal Control**.

Vzorka je neplatná, ak RNA vzorky a kontrola **Internal Control** nevykazujú amplifikačný signál v detekčnom systéme. Vo vzorke sa nachádzajú inhibítory alebo sa počas extrakčného procesu vyskytla chyba.

12. Limitácie metódy

1. Test RIDA[®]UNITY Norovirus I & II deteguje RNA norovírusov GI a norovírusov GII v neošetrených vzorkách ľudskej stolice. Z toho nemožno odvodiť súvislosť medzi úrovňou stanovenej hodnoty Ct a výskytom závažných klinických príznakov. Získané výsledky sa musia vždy interpretovať v kombinácii s celkovými klinickými príznakmi.
2. Diagnóza nemá byť založená len na výsledku molekulárnej biologickej analýzy, ale má vždy brať do úvahy anamnézu pacienta a príznaky.
3. Tento test je schválený na automatizované spracovanie pomocou systému RIDA[®]UNITY System.
4. Tento test je overený a validovaný len pre vzorky stolice.
5. Nesprávne odoberanie, preprava, skladovanie vzoriek a manipulácia s nimi alebo patogénna nálož pod analytickou citlivosťou testu môžu viesť k falošne negatívnym výsledkom.
6. Prítomnosť inhibítorov PCR môže viesť k falošne negatívnym alebo neplatným výsledkom.
7. Ako pri všetkých diagnostických testoch *in vitro* založených na PCR možno zistiť extrémne nízke koncentrácie cieľových sekvencií, ktoré sú pod limitom detekcie (LoD 95 %). Získané výsledky nie sú vždy reprodukovateľné.
8. Mutácie alebo polymorfizmy vo väzbových miestach priméru alebo sondy môžu interferovať s detekciou nových alebo neznámych variantov a môžu viesť k falošne negatívnym výsledkom pri použití testu RIDA[®]UNITY Norovirus I & II.
9. Pozitívny výsledok testu nemusí nevyhnutne znamenať prítomnosť životaschopných organizmov. Pozitívny výsledok označuje, že sú prítomné cieľové gény (norovírus GI a GII, spojovacia oblasť ORF1/ORF2).
10. Norovírusy genoskupiny IV, ktoré môžu vo veľmi zriedkavých prípadoch tiež infikovať ľudí, sú taktiež detegovateľné pomocou testu RIDA[®]UNITY Norovirus I & II.
11. Táto analýza sa má vykonať v súlade s nariadením o správnej laboratórnej praxi (SLP). Používatelia musia pri vykonávaní testu dôsledne dodržiavať pokyny výrobcu.

13. Charakteristiky výkonu

13.1 Klinické charakteristiky výkonu

Multiplexný PCR test v reálnom čase RIDA®UNITY Norovirus I & II bol v externom laboratóriu porovnaný s referenčným testom s označením CE na základe 237 vzoriek stolice od pacientov so symptómami gastrointestinálnej infekcie.

Výsledky ukazujú vysokú citlivosť a špecificitu pri detekcii norovírusov GI alebo GII vo vzorkách ľudskej stolice.

Tab. 12: Detekcia norovírusu GI

		Referenčná PCR		Spolu
		Pozitívne	Negatívne	
RIDA®UNITY Norovirus I & II - norovírus GI	Pozitívne	33	0	33
	Negatívne	3	201	204
	Spolu	36	201	237

Relatívna citlivosť (95 % IS)	91,7 % (77,5 % - 98,2 %)
Relatívna špecificita (95 % IS)	100 % (98,2 % - 100 %)

Tab. 13: Detekcia norovírusu GII

		Referenčná PCR		Spolu
		Pozitívne	Negatívne	
RIDA®UNITY Norovirus I & II - norovírus GII	Pozitívne	126	0	126
	Negatívne	4	107	111
	Spolu	130	107	237

Relatívna citlivosť (95 % IS)	96,9 % (92,3 % - 99,2 %)
Relatívna špecificita (95 % IS)	100 % (96,6 % - 100 %)

13.2 Charakteristiky analytického výkonu

13.2.1 Limit detekcie (LoD 95%)

Na stanovenie LoD sa pozitívna vzorka (pool negatívnych vzoriek stolice obohatený pozitívnymi klinickými vzorkami stolice) merala v piatich krokoch riedenia (v krokoch s prírastkami po 0,25) pre každý cieľ s 20 replikátmi na krok v jednej šarži. Potom nasledovala probitová analýza. Ďalej sa vypočítaná LoD potvrdila s 20 replikátmi na cieľ pre vypočítaný krok riedenia/koncentráciu.

Pri detekcii RNA norovírusu GI a norovírusu GII pomocou analýzy RIDA[®]UNITY Norovirus I & II a systému UNITY boli stanovené nasledujúce limity detekcie (LoD). Výsledky týchto meraní sú uvedené v tabuľke 15.

Tab. 15: Výsledky limitu detekcie testu RIDA[®]UNITY Norovirus I & II pre parametre norovírus GI a norovírus GII vo vzorkách stolice

	Norovírus GI	Norovírus GII
LoD	4,85E-04 [faktor riedenia]**	5,98E-05 [faktor riedenia]*

(*) Relatívne riedenie koncentrácie zásobného roztoku. Pozitívna klinická vzorka s rozsahom Ct 26 - 27.

(**) Relatívne riedenie koncentrácie zásobného roztoku. Pozitívna klinická vzorka s rozsahom Ct 30 - 31.

Hodnota LoD pre parameter norovírus GI vo vzorkách stolice bola stanovená na 4,85E-04 [faktor riedenia].

Hodnota LoD pre parameter norovírus GII vo vzorkách stolice bola stanovená na 5,98E-05 [faktor riedenia].

Pre rozšírený pracovný postup pomocou systému CFX96[™] Dx boli tieto hodnoty LoD potvrdené za predpokladu, že zostaneme v 2- až 3-násobnom rozsahu LoD.

13.2.2 Analytická špecificita

Rušivé látky

Prítomnosť inhibítorov PCR a rušivých látok môže viesť k falošne negatívnym alebo neplatným výsledkom. Preto sa skúmali účinky rôznych látok, ktoré môžu existovať, vzhľadom na ich rozšírené použitie pri gastrointestinálnych infekciách alebo rozšírený výskyt v zodpovedajúcich vzorkách.

Látky, ktoré by mohli potenciálne významne ovplyvniť výsledky testu, boli spočiatku skúmané vo vysokých koncentráciách (trojnásobok dennej dávky alebo simulácia najhoršieho prípadu) na interferenčnej obrazovke.

V prípade látok uvedených v tabuľke 16 sa nezistila žiadna interferencia.

Tab. 16: Potenciálne rušivé látky

Potenciálne rušivá látka	Koncentrácia
Ciprofloxacín-ratiopharm® 500 mg filmom obalené tablety (ciprofloxacín)	0,375 % [w/v]
Etanol	5 % na základe eluátu
Guanidínium hydrochlorid	5 % na základe eluátu
Ľudská krv	5 % [v/v]
Mucíny	5 % [w/v]
Kyselina stearová/palmitová	40 % [w/v]

Skrížené reakcie

Boli skúmané rôzne organizmy (baktérie, parazity a vírusy), ktoré sa môžu bežne nájsť v matrici stolice. Mikroorganizmy, ktoré sa majú skúmať v rámci tejto analýzy, boli vybrané buď preto, že sa prirodzene vyskytujú vo vzorkách stolice, alebo spôsobujú zodpovedajúce príznaky ako gastrointestinálne patogény. Na analýzy sa použili kultúry baktérií (medzi 10^7 a 10^9 CFU/mL) a húb alebo izoláty vírusov (z pozitívnych vzoriek stolice) príslušných organizmov.

Multiplexný PCR test RIDA®UNITY Norovirus I & II je špecifický pre norovírus GI a norovírus GII. S nasledujúcimi druhmi neboli zistené žiadne skrížené reaktivity (pozrite si tabuľku 17):

Tab. 17: Organizmy spôsobujúce potenciálne skríženú reaktivitu.

Organizmus	Výsledok testu*	
	Norovírus GI	Norovírus 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> (sérovar Enteritidis)	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (sérovar 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 Presnosť

Presnosť PCR testu v reálnom čase RIDA®UNITY Norovirus I & II bola stanovená pre nasledujúce úrovne posudzovania.

Presnosť *v rámci* analýzy: Stanovenie 5 kontrolných vzoriek pomocou 20 replikátov každej vzorky v systéme RIDA®UNITY System za identických podmienok.

Presnosť *medzi* analýzami: Stanovenie 5 kontrolných vzoriek v 20 cykloch duplicitne počas 10 pracovných dní (2 cykly za deň) vykonané na rôznych prístrojoch za reprodukovateľných podmienok.

Testovanie presnosti *v rámci* analýzy a *medzi* analýzami sa uskutočnilo s použitím troch rôznych šarží.

Získané variačné koeficienty príslušných meraní pomocou PCR testu v reálnom čase RIDA®UNITY Norovirus I & II neboli vyššie ako 4,82 % v systéme RIDA®UNITY System a ako 3,25 % v systéme CFX96™ Dx.

Tab. 18: Výsledky presnosti testu RIDA®UNITY Norovirus I & II pre norovírus GI (systém RIDA®UNITY System).

Priemerná hodnota Ct/VK	V rámci analýzy			Medzi analýzami			Medzi šaržami	
	Súprava šarže 1	Súprava šarže 2	Súprava šarže 3	Súprava šarže 1	Súprava šarže 2	Súprava šarže 3	Súprava šarží 1 - 3	
1	Ct	25,6	24,1	24,3	30,5	29,6	29,4	29,8
	VK (%)	1,27	0,58	0,97	2,97	1,51	2,16	3,04
2	Ct	29,5	29,2	29,3	29,1	28,4	28,3	28,6
	VK (%)	0,42	1,06	0,99	3,11	2,40	2,69	3,10
3	Ct	34,8	33,3	34,1	26,4	25,5	25,4	25,8
	VK (%)	1,11	1,00	1,44	3,01	1,77	2,40	3,14
4	Ct	33,0	33,5	31,9	29,7	28,8	28,7	29,1
	VK (%)	1,50	1,30	0,93	3,17	2,34	2,75	3,35
5	Ct	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne
	VK (%)	/	/	/	/	/	/	/

Tab. 19: Výsledky presnosti testu RIDA®UNITY Norovirus I & II pre norovírus GI (systém CFX96™ Dx).

Priemerná hodnota Ct/VK	V rámci analýzy			Medzi analýzami			Medzi šaržami	
	Súprava šarže 1	Súprava šarže 2	Súprava šarže 3	Súprava šarže 1	Súprava šarže 2	Súprava šarže 3	Súprava šarží 1 - 3	
1	Ct	26,7	26,1	25,4	29,6	29,0	28,7	29,1
	VK (%)	0,97	0,94	0,93	2,49	1,62	1,50	2,44
2	Ct	30,3	30,0	29,6	28,2	27,4	27,2	27,6
	VK (%)	0,72	0,90	0,51	2,20	1,75	1,66	2,66
3	Ct	33,1	32,6	32,5	25,7	25,2	25,0	25,3
	VK (%)	0,81	0,74	0,82	1,91	1,40	1,48	2,13
4	Ct	32,4	31,9	31,7	28,9	28,3	28,0	28,4
	VK (%)	1,16	0,74	0,64	2,83	1,95	1,98	2,72
5	Ct	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne
	VK (%)	/	/	/	/	/	/	/

Tab. 20: Výsledky presnosti testu RIDA®UNITY Norovirus I & II pre norovírus GI (systém RIDA®UNITY System).

Priemerná hodnota Ct/VK	V rámci analýzy			Medzi analýzami			Medzi šaržami	
	Súprava šarže 1	Súprava šarže 2	Súprava šarže 3	Súprava šarže 1	Súprava šarže 2	Súprava šarže 3	Súprava šarží 1 - 3	
1	Ct	23,4	21,7	21,7	28,4	26,9	26,8	27,4
	VK (%)	1,12	0,39	1,00	4,02	1,98	2,64	4,46
2	Ct	27,9	26,8	26,8	30,6	29,4	29,2	29,7
	VK (%)	0,76	0,77	0,75	3,42	2,33	2,64	3,69
3	Ct	33,6	31,6	32,3	23,7	22,6	22,4	22,9
	VK (%)	1,43	0,85	1,43	3,93	2,16	2,63	4,31
4	Ct	31,7	31,4	30,1	27,3	25,8	25,7	26,3
	VK (%)	1,45	1,31	0,96	4,30	2,86	3,34	4,82
5	Ct	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne
	VK (%)	/	/	/	/	/	/	/

Tab. 21: Výsledky presnosti testu RIDA®UNITY Norovirus I & II pre norovírus GI (systém CFX96™ Dx).

Priemerná hodnota Ct/VK	V rámci analýzy			Medzi analýzami			Medzi šaržami	
	Súprava šarže 1	Súprava šarže 2	Súprava šarže 3	Súprava šarže 1	Súprava šarže 2	Súprava šarže 3	Súprava šarží 1 - 3	
1	Ct	24,2	23,4	22,7	27,7	27,2	26,8	27,2
	VK (%)	1,07	1,02	1,23	3,19	2,06	1,91	2,94
2	Ct	28,6	28,3	27,8	29,1	28,3	28,1	28,5
	VK (%)	0,93	0,65	0,83	2,23	1,65	1,93	2,70
3	Ct	32,0	31,4	31,2	22,9	22,4	22,2	22,5
	VK (%)	0,85	0,90	0,61	2,28	1,42	1,57	2,45
4	Ct	30,8	30,2	30,0	26,6	26,1	25,8	26,2
	VK (%)	1,11	0,69	0,85	3,25	2,27	2,23	3,03
5	Ct	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne	Negatívne
	VK (%)	/	/	/	/	/	/	/

13.2.4 Analytická reaktivita

Reaktivita multiplexného RT-PCR testu v reálnom čase RIDA®UNITY Norovirus I & II bola skúmaná na definovanom paneli rôznych genotypov norovírusov génových skupín I a II (pozrite si tabuľku 22).

Tab. 22: Testovanie analytickej reaktivity

Kmeň	Výsledok*	
	Norovírus GII	Norovírus GI
Norovírus P31-GII4 Sydney	+	-
Norovírus GII.P4 New Orleans/GII.4 Sydney	+	-
Norovírus GII.P16-GII.4 Sydney	+	-
Norovírus GII.P16-GII.2	+	-
Norovírus GII.P31-GII.4 Sydney	+	-
Norovírus GII.7	+	-
Norovírus GI.3	-	+

*+ = pozitívny (aspoň 2 z 3 replikátov pozitívne)










- = negatívny

14. História verzie


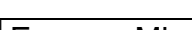

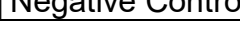
Číslo verzie	Časť a označenie
2022-08-09	Verzia vydania

15. Vysvetlenie symbolov

Všeobecné symboly

	Na diagnostické použitie <i>in vitro</i>
	Postupujte podľa návodu na použitie
	Číslo šarže
	Použite pred
	Teplota skladovania
	Číslo položky
	Počet testov
	Dátum výroby
	Výrobca

Symbole špecifické pre daný test

	Reakčná zmes
	Enzymová zmes
	Negatívna kontrola
	Pozitívna kontrola

16. Referencie

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).