

RIDA® UNITY Norovirus I & II

REF UN1415



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

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



1. Predvidena uporaba

Za uporabo v *in vitro* diagnostiki. Test RIDA®UNITY Norovirus I & II, ki se izvaja na platformi RIDA®UNITY, je multipleksna preiskava RT-PCR v realnem času za direktno kvalitativno zaznavanje in diferenciacijo RNA norovirusov genoskupin I (GI) in II (GII) v neobdelanih vzorcih blata oseb z znaki in simptomi akutnega gastroenteritisa.

Test RIDA®UNITY Norovirus I & II je namenjen podpori diferencialne diagnoze pri okužbah z norovirusi genoskupine I (GI) in genoskupine II (GII) pri bolnikih s simptomi gastroenteritisa v povezavi z drugimi kliničnimi in laboratorijskimi izvidi.

Negativni rezultati ne izključijo okužbe z norovirusom, zato se ne smejo uporabiti kot edina osnova za diagnozo.

Izdelek je namenjen profesionalni uporabi.

2. Povzetek in razlaga testa

Norovirusi so po vsem svetu eden najpogostejših vzrokov za nebakterijski gastroenteritis pri ljudeh vseh starostnih skupin in vsako leto povzročijo približno od 70.000 do 200.000 smrti.⁽¹⁾ Odgovorni so za približno 20 % vseh primerov akutnega gastroenteritisa po vsem svetu. Humani norovirusi, prej imenovani virusi Norwalk, so bili prvič identificirani leta 1972 v vzorcih blata, zbranih med izbruhom gastroenteritisa v Norwalku (Ohio, ZDA), in so tako postali prvi virusni patogeni, ki dokazano povzročajo gastroenteritis.⁽²⁾

Norovirusi spadajo v družino *Caliciviridae* in so majhni virusi brez ovojnice z enoverižno RNA (ssRNA). Na podlagi genskih zaporedij virusne, od RNA odvisne RNA-polimeraze in kapsidnega proteina se norovirusi delijo na 10 genoskupin (GI do GX) s trenutno več kot 49 različnimi genotipi (9 × GI, 27 × GII, 3 × GIII, 2 × GIV, 2 × GV, 2 × GVI in po 1 genotip GVII, GVIII, GIX [prej GII.15] ter GX) in različne seve. Genoskupine I, II in včasih IV so najpomembnejše v smislu povzročanja bolezni pri ljudeh.⁽¹⁾ V Združenih državah Amerike več kot 99 % vseh izbruhov norovirusov povzročijo virusi GI in GII.⁽³⁾ Gastroenteritis zaradi norovirusov je pogosto posledica prisotnosti virionov v blatu in izbljuvkih, za nastanek bolezni pa je potrebnih samo 10 kužnih delcev. Velika okoljska stabilnost in majhen infektivni odmerek sta razlog za visoko prenosljivost norovirusa.⁽⁴⁾ Značilni simptomi okužb z norovirusi so driska, bruhanje in navzea.⁽³⁾

3. Načelo testa

Test RIDA®UNITY Norovirus I & II multiplex real-time RT-PCR je molekularna diagnostična preiskava PCR za neposredno kvalitativno odkrivanje in razlikovanje RNA norovirusov genoskupine I (GI) in RNA norovirusov genoskupine II (GII) ter GIV v vzorcih človeškega blata. Obdelava je popolnoma samodejna in poteka na sistemu RIDA®UNITY. Najprej se nukleinske kisline ekstrahirajo z uporabo kompletov RIDA®UNITY Universal Extraction Kit in Internal Control Kit. Tarčno zaporedje se zaznava v obliki RT-PCR v realnem času z enim korakom, tj. reverzna transkripcija (RT) in poznejši PCR se izvedeta v eni viali za reakcijo. Med postopkom se izolirana RNA s pomočjo reverzne transkriptaze prepíše v cDNA. Genski fragmenti, specifični za skupine norovirusov GI in GII/GIV, se potem amplificirajo z metodo PCR v realnem času.

Amplificirana tarčna zaporedja (regija spoja ORF1/ORF2) se zaznajo s hidroliznimi sondami, označenimi z dušilcem na enem koncu in barvilom, ki fluorescira (fluorofor), na drugem koncu. V prisotnosti tarčnega zaporedja se sonde hibridizirajo do ampikona. Med podaljševanjem polimeraze Taq loči poročevalca od dušilca. Poročevalec oddaja fluorescentni signal, ki ga zazna optična enota instrumenta za preiskavo PCR v realnem času. Fluorescentni signal se poveča s količino ustvarjenih ampikonov. Komplet RIDA®UNITY Internal Control Kit je treba uporabljati sočasno, da je mogoče preverjanje priprave vzorca in/ali morebitnega zaviranja PCR.

4. Priloženi reagenti

Reagenti v kompletu zadostujejo za 96 določitev.*

Preglednica 1: Priloženi reagenti

REF	Reagent	Količina		Barva pokrovčka
UNZ1415RM	Reaction Mix	1 ×	1935 µL	rumena, pripravljeno za uporabo
UNZ1415EM	Enzyme Mix	1 ×	350 µL	rdeča, pripravljeno za uporabo
UNZ1415PC	Positive Control	1 ×	200 µL	modra, pripravljeno za uporabo
UNZ1415NC	Negative Control	1 ×	450 µL	bela, pripravljeno za uporabo

* Število reakcij je mogoče zmanjšati z večkratno uporabo in majhnimi serijami.

5. Navodila za shranjevanje

- Upoštevajte smernice za ravnanje v preglednici 2 in komplet shranite takoj po uporabi skladno z navedenimi informacijami.
- Vse reagente je treba shranjevati zaščitene pred svetlobo pri temperaturi od -16 do -28 °C. Če niso odprti, se lahko uporabljajo do roka uporabnosti, natisnjene na oznaki. Po izteku roka uporabnosti ni mogoče več jamčiti kakovosti.
- Vse reagente je treba pred uporabo previdno odtaliti (npr. v hladilniku pri temperaturi 2-8 °C).
- Do 8-kratna ponovitev zamrzovanja in odtajanja ne vpliva na lastnosti testa.

Preglednica 2: Pogoji shranjevanja in podatki o shranjevanju

	Temperatura shranjevanja	Najdaljši čas shranjevanja
neodprto	-16 do -28 °C	Uporabi se lahko do natisnjene roka uporabnosti
odprto	-16 do -28 °C	8 ciklov zamrzovanja in odtajanja

6. Potrebni materiali, ki niso priloženi

Test RIDA[®]UNITY Norovirus I & II multiplex real-time RT-PCR je namenjen samo uporabi skupaj s sistemom RIDA[®]UNITY. Za pravilno uporabo so nujni naslednji izdelki:

6.1 Reagenti

Za izvedbo testa RIDA[®]UNITY Norovirus I & II so potrebni naslednji reagenti:

Reagenti	Številka artikla
RIDA [®] UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA [®] UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Laboratorijska oprema

Za izvedbo testa RIDA[®]UNITY Norovirus I & II je potrebna naslednja oprema:

Oprema
Sistem RIDA [®] UNITY; kat. št.: ZUNITY (R-Biopharm AG)
Potrošni material RIDA [®] UNITY (konice, ploščice, reakcijske vialice, filmi). Za informacije o naročanju potrošnega materiala glejte navodila za uporabo sistema RIDA [®] UNITY.
Vrtinčni mešalnik
Namizna centrifuga
Rokavice za enkratno uporabo brez smukca
Zunanji ciklični termostat (morebitna nadgradnja sistema)
CFX96 [™] Dx (Bio-Rad)

Komplet RIDA[®]UNITY Norovirus I & II se lahko uporablja skupaj z drugimi združljivimi cikličnimi termostati. Druge instrumente za PCR v realnem času mora potrditi/validirati uporabnik. Če želite preveriti združljivost, se obrnite na družbo R-Biopharm AG na elektronski naslov pcr@r-biopharm.de.

7. Opozorila in previdnostni ukrepi za uporabnike

Za uporabo v *in vitro* diagnostiki.

Ta test sme izvajati samo kvalificirano laboratorijsko osebje. Upoštevati je treba smernice za delo v medicinskih laboratorijih.

Pri izvajanju tega testa vedno natančno upoštevajte navodila za uporabo.

Vzorcev in reagentov ne pipetirajte z usti. Preprečite stik z razpokano kožo in sluznicami.

Pri ravnanju z reagenti in vzorci nosite osebno varovalno opremo (ustrezne rokavice, laboratorijsko haljo, varnostna očala) ter si po koncu testa umijte roke.

V prostorih ravnanja z vzorci ne kadite ter ne uživajte hrane in pijače.

Preprečite kontaminacijo vzorcev in komponent kompleta z mikrobi ter nukleazami (DNazo/RNazo).

Klinične vzorce je treba obravnavati kot morebitno kužne in jih je treba ustrezno zavreči, tako kot vse reagente in materiale, ki pridejo v stik z morebitno kužnimi vzorci.

Komponent (mešanice Reaction Mix, mešanice Enzyme Mix, kontrole Positive Control, kontrole Negative Control), ki pripadajo kompletu ene serije, ne zamenjajte in ne mešajte s komponentami v kompletu druge serije.

Testni komplet se lahko uporablja 8 tednov po prvem odprtju (komplet je mogoče znova naložiti 6-krat). Testnega kompleta ne uporabljajte po izteku roka uporabnosti. Te specifikacije preveri tudi sistem RIDA®UNITY.

Uporabniki so odgovorni za ustrezno odstranjevanje vseh reagentov in materiala po uporabi. Pri odstranjevanju upoštevajte nacionalne predpise.

Dodatne podrobnosti o varnostnem listu (Safety Data Sheet, SDS) najdete pod številko artikla na spletni strani <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Za uporabnike v Evropski uniji: O vseh resnih neželenih dogodkih, povezanih z izdelkom, poročajte družbi R-Biopharm AG in ustreznim nacionalnim organom.

8. Pridobivanje in shranjevanje vzorcev

Za doseganje najboljšega delovanja testa RIDA[®]UNITY Norovirus I & II je priporočljivo uporabiti material svežega vzorca.

Preprečite večkratno odtajanje in zamrzovanje vzorca.

Vzorci blata se ne smejo odvzeti v transportne vsebnike, ki vsebujejo transportno sredstvo s konzervansi, živalskimi serumi, kovinskimi ioni, oksidacijskimi sredstvi ali detergenti, saj lahko take snovi motijo teste RIDA[®]UNITY.

Priporočljivo je ustvariti alikvote vzorcev, da se izognete večkratnemu odtajanju in zamrzovanju. Zamrznjene vzorce je treba odtajati tik pred ekstrakcijo, da se prepreči degradacija nukleinskih kislin.

Upoštevajte navodila za shranjevanje vzorcev v preglednicah od 3 do 6.

Preglednica 3: Shranjevanje vzorcev - zaznavanje norovirusov GI

Nativni vzorci - blato		
20-25 °C	2-8 °C	-20/-80 °C
≤ 7 dni	≤ 9 dni	≤ 6 mesecev

V eluatu (iz blata)		
30 °C	2-8 °C	-20 °C
≤ 24 ur	≤ 36 ur	≤ 1 mesec

Pri temperaturi shranjevanja -20/-80 °C, do 5-kratni cikel zamrzovanja/odtajanja vzorca blata ne vpliva na lastnosti testa.

Pri temperaturi shranjevanja -20 °C, do 3-kratni cikel zamrzovanja/odtajanja eluata (iz blata) ne vpliva na lastnosti testa.

Preglednica 4: Shranjevanje vzorcev - zaznavanje norovirusov GII

Nativni vzorci - blato		
20-25 °C	2-8 °C	-20/-80 °C
≤ 7 dni	≤ 9 dni	≤ 6 mesecev

V eluatu (iz blata)		
30 °C	2-8 °C	-20 °C
≤ 24 ur	≤ 36 ur	≤ 1 mesec

Pri temperaturi shranjevanja -20/-80 °C, do 5-kratni cikel zamrzovanja/odtajanja vzorca blata ne vpliva na lastnosti testa.

Pri temperaturi shranjevanja -20 °C, do 3-kratni cikel zamrzovanja/odtajanja eluata (iz blata) ne vpliva na lastnosti testa.

8.1 Priprava DNA iz vzorcev blata

Za izolacijo DNA iz vzorcev blata uporabite komplet RIDA[®]UNITY Universal Extraction Kit. Upoštevajte ustrezne postopke v navodilih za uporabo kompleta RIDA[®]UNITY Universal Extraction Kit (poglavje: Priprava nukleinskih kislin iz vzorcev blata).

9. Testni postopek

Ob začetku uporabe vzorce in reagente testa RIDA[®]UNITY Norovirus I & II postavite na sistem RIDA[®]UNITY.

Pred tem z vrtničnim mešalnikom ustrezno zmešajte izdelke **Reaction Mix**, **Negative Control** in **Positive Control**. Ne vrtničite izdelka **Enzyme Mix**. Potem na kratko centrifugirajte vse sestavine.

Epruvete PCR za vzorce, namenjene preiskavi, je treba pred tem postaviti v vgrajeni ciklični termostat PCR.

Za pravilno nalaganje reagentov in potrošnih materialov na sistem so na voljo nosilci.

Za postopek nalaganja upoštevajte navodila sistema RIDA[®]UNITY. Upoštevajte ustrezna poglavja v priročniku sistema RIDA[®]UNITY (poglavje: Izvajanje analize).

Test RIDA[®]UNITY Norovirus I & II se sme uporabljati samo v kombinaciji s kompletom RIDA[®]UNITY Internal Control Kit. To omogoča zgodnje prepoznavanje možnega zaviranja PCR, potrjevanje neoporečnosti reagentov in potrjevanje uspešne ekstrakcije nukleinskih kislin. Postopek je opisan v navodilih za uporabo kompleta RIDA[®]UNITY Internal Control Kit (poglavje: Testni postopek).

Samodejna obdelava je opisana v priročniku sistema RIDA[®]UNITY (poglavje: Izvajanje analize).

9.1 Nastavitve pripomočka

9.1.1 Univerzalni profil preiskave PCR v realnem času

Za uskladitev analiz RIDA®UNITY se je test RIDA®UNITY Norovirus I & II preveril izrecno v univerzalnem profilu. To omogoča medsebojno kombiniranje testov DNA in RNA. Na splošno je v univerzalnem profilu prva reverzna transkripcija.

Preglednica 7: Univerzalni profil preiskave PCR v realnem času za instrument RIDA®UNITY

<u>Reverzna transkripcija</u>	10 min, 58 °C
Prvotna denaturacija	1 min, 95 °C
Cikli	45 ciklov
<u>PCR</u> Denaturacija	10 s, 95 °C
Prileganje/podaljšanje	15 s, 60 °C
Hitrost prehoda temperature/ hitrost spremembe	Najdaljši čas

Opomba: Prileganje in podaljšanje se izvedeta med istim korakom.

Preglednica 8: Univerzalni profil preiskave PCR v realnem času za instrument CFX96™ Dx

<u>Reverzna transkripcija</u>	10 min, 58 °C
Prvotna denaturacija	1 min, 95 °C
Cikli	45 ciklov
<u>PCR</u> Denaturacija	15 s, 95 °C
Prileganje/podaljšanje	30 s, 60 °C
Hitrost prehoda temperature/ hitrost spremembe	Najdaljši čas

Opomba: Prileganje in podaljšanje se izvedeta med istim korakom.

9.2 Nastavitve kanala za zaznavanje

Preglednica 9: Izbira ustreznih kanalov za zaznavanje

Instrument za preiskave PCR v realnem času	Zaznavanje	Kanal za zaznavanje	Opomba
R-Biopharm RIDA®UNITY	Norovirus GII	FAM	SEEK channel GGII
	Interna kontrola	HEX	SEEK channel ICD
	Norovirus GI	Cy5	SEEK channel GGI
Bio-Rad CFX96™ Dx	Norovirus GII	FAM	SEEK channel GGII
	Interna kontrola	VIC	SEEK channel ICD
	Norovirus GI	Cy5	SEEK channel GGI

10. Kontrola kakovosti - indikacija nestabilnosti ali poteka roka uporabnosti reagentov

Vzorci se ocenijo z analitično programsko opremo RIDA®SEEK sistema RIDA®UNITY. Kontrolni **Negative Control** in **Positive Control** morata pokazati pravilne rezultate (glejte preglednico 9).

Kontrola **Positive Control** je na voljo v koncentraciji 10^3 kopij/ μL . Pri vsaki preiskavi PCR se uporabi v skupni količini 5×10^3 kopij.

Kontrola **Negative Control** že vsebuje in interno kontrolo RIDA®UNITY Internal Control. Ker kontrole ne vsebujejo predloge, v tarčnih kanalih ni pričakovati signalov. Pozitivni signali v IC-kanalu, s katerimi se zazna interna kontrola, so nujni (glejte preglednico 10).

Preglednica 10: Veljavna preiskava PCR mora izpolnjevati naslednje pogoje:

Vzorec	Rezultat	IC Ct	Tarčni gen Ct
Pozitivna kontrola	+	/*	Glejte potrdilo o analizi (Certificate of Analysis, CoA)
Negativna kontrola	-	Ct > 20	0

* V nekaterih primerih ima lahko IC-kanal pozitiven signal v pozitivni kontroli, zato ga ni treba oceniti.

Če pozitivna kontrola ni znotraj opredeljenega razpona Ct, negativna kontrola pa je veljavna, je treba vse reakcije, vključno s kontrolami, znova analizirati z metodo PCR.

Če negativna kontrola ni negativna, pozitivna kontrola pa je veljavna, je treba vse reakcije, vključno s kontrolami, znova analizirati z metodo PCR.

Če navedene vrednosti niso dosežene, pred ponovitvijo testa preverite naslednje:

- Rok uporabnosti pri uporabljenih reagentih.
- Funkcionalnost uporabljene opreme.
- Ustreznost testnega postopka.

Če po ponovitvi testa pogoji še vedno niso izpolnjeni, se posvetujte s proizvajalcem ali lokalnim distributerjem družbe R-Biopharm.

11. Ocenjevanje in interpretacija

Ocenjevanje in interpretacija vzorca se izvedeta z analitično programsko opremo sistema RIDA®UNITY, RIDA®SEEK.

Trenutno ni mednarodno priznane referenčne metode ali referenčnega materiala za standardizacijo. Kontrolni materiali so metrološko sledljivi do internih standardov družbe R-Biopharm AG, ki temeljijo na specifičnih sintetičnih amplikonih RNA.

Za dodatne informacije o metrološki sledljivosti se obrnite na družbo R-Biopharm AG.

Opređeljene vrednosti, območja in dodatne podrobnosti so v priloženem certifikatu (Certificate of Analysis, CoA).

Preglednica 11: Interpretacija rezultatov*

Zaznavanje			
Norovirus GII	Norovirus GI	IC	Rezultat
+	-	+/-	Norovirus GII ¹ zaznaven
-	+	+/-	Norovirus GI zaznaven
+	+	+/-	Norovirus GII ¹ in norovirus GI zaznavna
-	-	+	Tarčni geni niso zaznavni
-	-	-	Neveljavno

*+ = pozitivno

- = negativno

¹ Glejte Omejitve metode (poglavje 10).

Vzorec je pozitiven, če RNA v vzorcu in kontrola **Internal Control** v sistemu za zaznavanje pokažeta signal amplifikacije.

Vzorec se prav tako obravnava kot pozitiven, če RNA v vzorcu pokaže signal amplifikacije, vendar na sistemu zaznavanja ni viden signal amplifikacije kontrole **Internal Control**. Zaznavanje kontrole **Internal Control** v tem primeru ni nujno, saj lahko velike koncentracije amplikonov povzročijo šibek ali odsoten signal kontrole **Internal Control**.

Vzorec se obravnava kot negativen, če RNA v vzorcu ne pokaže signala amplifikacije, vendar je na sistemu zaznavanja viden signal amplifikacije kontrole **Internal Control**. Z zaznavanjem **Internal Control** je mogoče izključiti zaviranje reakcije PCR pred ekstrakcijo.

Vzorec je neveljaven, če RNA v vzorcu in kontrola **Internal Control** v sistemu za zaznavanje ne pokažeta signala amplifikacije. V vzorcu so lahko prisotni zaviralci ali pa je med procesom ekstrakcije prišlo do napake.

12. Omejitve metode

1. Test RIDA[®]UNITY Norovirus I & II zaznava RNA norovirusov GI in norovirusov GII v neobdelanih vzorcih človeškega blata. Iz tega ni mogoče izpeljati povezave med stopnjo določene vrednosti Ct in pojavnostjo hudih kliničnih simptomov. Dobljene rezultate je treba vedno interpretirati v kombinaciji z vsemi kliničnimi simptomi.
2. Diagnoza ne sme temeljiti samo na rezultatu molekularne biološke analize, ampak mora vedno upoštevati bolnikovo zdravstveno anamnezo in simptome.
3. Ta test je odobren samo za samodejno obdelavo z uporabo sistema RIDA[®]UNITY.
4. Ta test je potrjen in validiran samo za vzorce blata.
5. Nepravilno vzorčenje, transport, shranjevanje in ravnanje z vzorci ali obremenitev s patogeni pod analitično občutljivostjo testa lahko povzročijo lažno negativne rezultate.
6. Prisotnost zaviralcev PCR lahko privede do lažno negativnih ali neveljavnih rezultatov.
7. Kot pri vseh *in vitro* diagnostičnih testih na osnovi PCR je mogoče zaznati izjemno majhne koncentracije tarčnih zaporedij, ki so pod mejo zaznavnosti (LoD 95 %). Dobljenih rezultatov ni vedno mogoče ponoviti.
8. Mutacije ali polimorfizmi na mestih vezave začetnika ali sonde lahko ovirajo zaznavanje novih ali neznanih variacij ter lahko povzročijo lažno negativne rezultate testa RIDA[®]UNITY Norovirus I & II.
9. Ni nujno, da pozitiven rezultat pomeni prisotnost viabilnih organizmov. Pozitiven rezultat kaže na prisotnost tarčnih genov (norovirusov GI in GII; regija spoja ORF1/ORF2).
10. S testom RIDA[®]UNITY Norovirus I & II se prav tako zaznavajo norovirusi iz genoskupine IV, ki lahko v redkih primerih okužijo tudi ljudi.
11. To preiskavo je treba izvajati skladno s predpisom o dobri laboratorijski praksi (DLP). Uporabniki morajo pri izvajanju testa natančno upoštevati navodila proizvajalca.

13. Lastnosti delovanja

13.1 Klinične lastnosti delovanja

Multipleksna preiskava PCR v realnem času RIDA®UNITY Norovirus I & II so v zunanjem laboratoriju primerjali z referenčnim testom z oznako CE na osnovi 237 vzorcev blata bolnikov s simptomi okužbe prebavil.

Rezultati kažejo veliko občutljivost in specifičnost pri zaznavanju norovirusov GI in GII v vzorcih človeškega blata.

Preglednica 12: Zaznavanje norovirusa GI

		Referenčni PCR		Skupno
		Pozitivno	Negativno	
RIDA®UNITY Norovirus I & II - Norovirus GI	Pozitivno	33	0	33
	Negativno	3	201	204
	Skupno	36	201	237

Relativna občutljivost (95-% IZ)	91,7 % (77,5-98,2 %)
Relativna specifičnost (95-% IZ)	100 % (98,2-100 %)

Preglednica 13: Zaznavanje norovirusa GII

		Referenčni PCR		Skupno
		Pozitivno	Negativno	
RIDA®UNITY Norovirus I & II - Norovirus GII	Pozitivno	126	0	126
	Negativno	4	107	111
	Skupno	130	107	237

Relativna občutljivost (95-% IZ)	96,9 % (92,3-99,2 %)
Relativna specifičnost (95-% IZ)	100 % (96,6-100 %)

13.2 Analitične lastnosti delovanja

13.2.1 Meja zaznavnosti (LoD 95%)

Za določanje meje zaznavnosti so pozitivni vzorec (združeni negativni vzorci blata, zmešani s pozitivnimi kliničnimi vzorci blata) izmerili v petih korakih redčenja (v korakih po 0,25 log) za vsako tarčo z 20 ponovitvami na korak znotraj ene serije. Temu je sledila analiza probit. Izračunana meja LoD je bila potrjena z 20 ponovitvami na tarčo za izračunan korak/koncentracijo redčenja.

Pri zaznavanju RNA norovirusov GI in norovirusov GII z uporabo preiskave RIDA®UNITY Norovirus I & II na sistemu UNITY so določili naslednje meje zaznavnosti (LoD).

Rezultati teh meritev so prikazani v preglednici 15.

Preglednica 15: Rezultati meje zaznavnosti pri testu RIDA®UNITY Norovirus I & II za parametra norovirusov GI in norovirusov GII v vzorcih blata

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

(*) Relativno redčenje koncentracije osnovne raztopine. Pozitivni klinični vzorec z razponom Ct 26-27

(**) Relativno redčenje koncentracije osnovne raztopine. Pozitivni klinični vzorec z razponom Ct 30-31

LoD za parameter norovirus GI v vzorcih blata je bil določen pri 4,85 E-04 [faktor redčenja].

LoD za parameter norovirus GII v vzorcih blata je bil določen pri 5,98 E-05 [faktor redčenja].

Pri nadgrajenem delovnem postopku s sistemom CFX96™ Dx so te vrednosti LoD potrdili na osnovi predvidevanja, da ostanemo znotraj 2- do 3-kratnega razpona LoD.

13.2.2 Analitična specifičnost

Motilci

Prisotnost zaviralcev PCR in motilcev lahko privede do lažno negativnih ali neveljavnih rezultatov. Zato so raziskali učinke različnih snovi, ki lahko obstajajo zaradi njihove obsežne uporabe pri okužbah prebavil ali obširne pojavnosti. Snovi, ki bi morda lahko pomembno vplivale na rezultate testov, so bile na začetku pregledane pri visokih koncentracijah (trojni dnevni odmerek ali simulacija najslabšega primera) v okviru presejanja zaradi motenj. Pri snoveh, navedenih v preglednici 16, niso ugotovili nobenih motenj.

Preglednica 16: Možni motilci

Možen motilec	Koncentracija
Ciprofloxacín-ratiopharm® 500 mg filmsko obložene tablete (ciprofloksacín)	0,375 % [m/v]
Etanol	5 % na osnovi eluata
Gvanidinijev klorid	5 % na osnovi eluata
Človeška kri	5 % [% vol.]
Mucini	5 % [m/v]
Stearinska/palmitinska kislina	40 % [m/v]

Navzkrižne reakcije

Raziskali so različne organizme (bakterije, parazite in viruse), ki so pogosti v matriksu blata. Mikroorganizme, raziskane pri tem testu, so izbrali zaradi njihove naravne pojavnosti v vzorcih blata ali ker povzročajo ustrezajoče simptome kot gastrointestinalni patogeni. Pri analizah so uporabili kulture bakterij (med 10^7 in 10^9 CFU/mL) in kulture gliv ali virusne izolate (iz pozitivnih vzorcev blata) za zadevne organizme.

Test RIDA[®]UNITY Norovirus I & II multiplex real-time PCR je specifičen za noroviruse GI in noroviruse GII. Z naslednjimi vrstami niso ugotovili nobene navzkrižne reaktivnosti (glejte preglednico 17):

Preglednica 17: Morebitno navzkrižno reaktivni organizmi.

Organizem	Rezultat testa*	
	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> (serotip Enteritidis)	-	-
<i>Salmonella enterica</i> (serotip 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 Natančnost

Natančnost testa RIDA®UNITY Norovirus I & II real-time PCR je bila določena z upoštevanjem naslednjega.

Natančnost *znotraj* testa: Določanje 5 kontrolnih vzorcev z uporabo 20 ponovitev na instrumentu RIDA®UNITY pri identičnih pogojih.

Natančnost *med* testi: Določanje 5 kontrolnih vzorcev pri 20 podvojenih izvedbah testa v 10 delovnih dneh (2 izvedbi na dan) na različnih instrumentih pri ponovljivih pogojih.

Testiranje za natančnost *znotraj* testa in natančnost *med* testi so izvedli z uporabo treh različnih serij.

Pridobljeni koeficienti variacije za zadevne meritve s testom RIDA®UNITY Norovirus I & II real-time PCR so bili manjši od 4,82 % na sistemu RIDA®UNITY in manjši od 3,25 % na sistemu CFX96™ Dx.

Preglednica 18: Rezultati natančnosti testa RIDA®UNITY Norovirus I & II za noroviruse GI (sistem RIDA®UNITY)

Povprečna vrednost Ct/CV	Znotraj testa			Med testi			Med serijami	
	Serijska kompleta 1	Serijska kompleta 2	Serijska kompleta 3	Serijska kompleta 1	Serijska kompleta 2	Serijska kompleta 3	Serijska kompleta 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	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

Preglednica 19: Rezultati natančnosti testa RIDA®UNITY Norovirus I & II za noroviruse GI (CFX96™ Dx)

Povprečna vrednost Ct/CV	Znotraj testa			Med testi			Med serijami	
	Serijska kompleta 1	Serijska kompleta 2	Serijska kompleta 3	Serijska kompleta 1	Serijska kompleta 2	Serijska kompleta 3	Serijska kompleta 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	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

Preglednica 20: Rezultati natančnosti testa RIDA®UNITY Norovirus I & II za noroviruse GII (sistem RIDA®UNITY)

Povprečna vrednost Ct/CV	Znotraj testa			Med testi			Med serijami	
	Serijska kompleta 1	Serijska kompleta 2	Serijska kompleta 3	Serijska kompleta 1	Serijska kompleta 2	Serijska kompleta 3	Serijske kompleta 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	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

Preglednica 21: Rezultati natančnosti testa RIDA®UNITY Norovirus I & II za noroviruse GII (CFX96™ Dx)

Povprečna vrednost Ct/CV	Znotraj testa			Med testi			Med serijami	
	Serijska kompleta 1	Serijska kompleta 2	Serijska kompleta 3	Serijska kompleta 1	Serijska kompleta 2	Serijska kompleta 3	Serijske komplete 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	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno	Negativno
	CV (%)	/	/	/	/	/	/	/

13.2.4 Analitična reaktivnost

Reaktivnost multipleksnega testa RT-PCR v realnem času RIDA®UNITY Norovirus I & II so preiskali na opredeljenem panelu različnih genotipov norovirusov iz genoskupin I in II (glejte preglednico 22).

Preglednica 22: Testiranje analitične reaktivnosti

Sev	Rezultat*	
	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	-	+

*+ = pozitivno (pozitivna najmanj 2 od 3 replikatov)










- = negativno

14. Zgodovina različic

Številka različice	Del in oznaka
2022-08-09	Različica izdaje

15. Razlaga simbolov

Splošni simboli

	Za uporabo v <i>in vitro</i> diagnostiki
	Upoštevajte navodila za uporabo
	Serijska številka
	Rok uporabnosti
	Temperatura shranjevanja
	Številka artikla
	Število testov
	Datum izdelave
	Proizvajalec

Za test specifični simboli

	Reakcijska Mešanica
	Encimska mešanica
	Negativna kontrola
	Pozitivna kontrola

16. Reference

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).