



# SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

## Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!  
See the following pages for more information!



### Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

### Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

### SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

[mail@szabo-scandic.com](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

# RIDA®GENE Pediatric Viral Panel

Multiplex real-time RT-PCR für den Nachweis aus Nasen-/Rachenabstrichen



## Targets:

Rhinovirus/Enterovirus/Parechovirus, Bocavirus, Adenovirus



## Zuverlässig:

Kit enthält eine Interne Kontrolle, sowie eine Positiv- und Negativkontrolle



## Praktisch:

Gleiche Anwendung bei allen RIDA®GENE Produkten

# Informationen zu RIDA®GENE Pediatric Viral Panel

Art. Nr. PG4725

## Ihre Vorteile



### Hohe analytische Sensitivität:

Gerätenachweisgrenze: > 50 Kopien/Reaktion



### Hohe analytische Spezifität:

- Überprüfung von potenziell interferierenden Substanzen
- Überprüfung der Kreuzreaktivität



### Einfach und schnell:

< 2 Stunden



### Testformat:

Kit ist ausreichend für 100 Reaktionen



### Qualität:

Entwicklung und Herstellung in Deutschland unter ISO 13485

RIDA®GENE Pediatric Viral Panel, Art. Nr. PG4725



## Diagnostik von Viralen Respiratorischen Infektionen

Für die *in-vitro* Diagnostik. Der RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Test, der auf dem LightCycler® 480 II durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und Differenzierung von Rhinovirus-/Enterovirus-/Parechovirus-RNA, Bocavirus- und Adenovirus-DNA aus unbehandelten humanen Nasen-/Rachenabstrichen von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer respiratorischen Infektion.

Erreger	Target
Rhinovirus/Enterovirus/ Parechovirus	5'UTR
Bocavirus	5'NTR
Adenovirus	Hexon

**Rhinoviren, Enteroviren und Parechoviren** sind bekannte Ursachen für Erkrankungen, vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern<sup>(1, 2, 3)</sup>. **Rhinoviren** können Otitis media, Krupp, Bronchiolitis oder Lungentzündungen auslösen<sup>(1)</sup>, während **Enterovirus-Infektionen** zu akuten Fieber-erkrankungen bis hin zu Meningitis, Endokarditis, Hepatitis und akuter schlaffer Myelitis führen können<sup>(2)</sup>. **Parechoviren** lösen leichte Atemwegs-Symptome bis hin zu schweren neurologischen Erkrankungen (Meningitis, Enzephalitis) aus<sup>(3)</sup>.

**Bocaviruses** sind mit Infektionen des Respirationstrakts assoziiert. Die respiratorischen Infektionen äußern sich mit leichten Erkältungssymptomen oder schwere Lungenentzündung und Bronchiolitis.<sup>(4)</sup>

**Adenovirus** gilt als häufige Ursache für Infektionen der Atemwege. Es können Infektionen der oberen oder unteren Atemwege, die bei immunsupprimierten Personen zu einer Pneumonie oder dem Akuten Atemnotsyndrom (ARDS) führen können, auftreten<sup>(5)</sup>.



1. Vandini S, Biagi C, Fischer M, Lanari M. Impact of Rhinovirus Infections in Children. *Viruses*. 2019;11(6).
2. Wells AI, Coyne CB. Enteroviruses: A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion. *Viruses*. 2019;11(5).
3. Brouwer L, Wolthers KC, Pajkrt D. Parechovirus A prevalence in adults in The Netherlands. *Arch Virol*. 2020;165(4):963-6.
4. Yan Z, Deng X, Qiu J. Human Bocavirus 1 Infection of Well-Differentiated Human Airway Epithelium. *Curr Protoc Microbiol*. 2020;58(1):e107.
5. Shieh WJ. Human adenovirus infections in pediatric population - an update on clinicopathologic correlation. *Biomed J*. 2021.

## RIDA® GENE Pediatric Viral Panel

**REF** PG4725



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

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



Deutsch .....	3
English.....	27
Español.....	51
Français.....	75
Italiano .....	99
Português .....	123

# RIDA®GENE Pediatric Viral Panel

**REF** PG4725

## 1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Der RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Test, der auf dem LightCycler® 480 II real-time PCR Gerät durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und Differenzierung von Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus RNA, Bocavirus DNA und Adenovirus DNA aus unbehandelten humanen Nasen-/Rachenabstrichen von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer respiratorischen Infektion.

Der RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Test ist zur Unterstützung der Differentialdiagnose von Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus, Bocavirus und Adenovirus-Infektionen bei Patienten mit Symptomen einer respiratorischen Infektion in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen. Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus, Bocavirus und Adenovirus nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden.

Das Produkt ist für die professionelle Anwendung vorgesehen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Virusinfektionen der Atemwege sind eine der Hauptursachen für Krankenhauseinweisungen und Klinikbesuche bei Kindern und älteren Menschen<sup>(1-6)</sup>. Neben den bekannten respiratorischen Viren wie Influenza und SARS-CoV-2 können Infektionen der Atemwege durch Adenoviren, Bocaviren, Enteroviren, Parechoviren und Rhinoviren hervorgerufen werden.

Humane Adenoviren (HAdV) gehören zur Familie der Adenoviridae und zur Gattung Mastadenovirus. Es sind Ikosaeder-förmige, 65-110 nm im Durchmesser, unbehüllte und doppelsträngige DNA-Viren. Sie werden in sieben Arten (A-G) eingeteilt, die etwa 67 Serotypen umfassen<sup>(7,8)</sup>.

Humane Bocaviren (HBoV) sind ikosaedrische, kleine und unbehüllte Parvoviren<sup>(9-11)</sup>. Sie haben einen Durchmesser von etwa 18 nm bis 26 nm und besitzen eine einzelsträngige DNA mit einer Genomgröße von 4 kb bis 6 kb (plus terminale Sequenzen von 32-52 Nukleotiden). Die Rolle des HBoV als harmloser Passagier wird noch kontrovers diskutiert, da es häufig in Kombination mit anderen Erregern

isoliert wird. HBoVs umfassen die vier Subtypen HBoV1, HBoV2, HBoV3 und HBoV4<sup>(9,10)</sup>.

Enteroviren und Rhinoviren sind einzelsträngige, ikosaedrische und unbehüllte RNA-Viren mit einer Genomgröße von etwa 7,2 kb<sup>(12-15)</sup>. Vor der Einführung molekularer Werkzeuge zur Klassifizierung von Krankheitserregern wurde angenommen, dass Rhinoviren und Enteroviren zwei sehr unterschiedliche Krankheitserreger sind<sup>(15)</sup>. Heute weiß man, dass sie genetisch miteinander verwandt sind. Sie gehören beide zur Gattung Enterovirus innerhalb der Familie Picornaviridae<sup>(13-17)</sup>. Die Humanen Enteroviren (HEV) umfassen die vier Spezies HEV-A, HEV-B, HEV-C und HEV-D mit über 200 verschiedenen Serotypen. Rhinoviren werden in drei Spezies Rhinovirus A, Rhinovirus B und Rhinovirus C eingeteilt, die ca. 150 verschiedene Typen umfassen<sup>(12-18)</sup>. Wie Enteroviren und Rhinoviren gehören die humanen Parechoviren (HPeV) zur Familie der Picornaviridae allerdings werden sie der Gattung Parechovirus zugeordnet<sup>(16,17,19-22)</sup>. Sie sind einzelsträngige, unbehüllte RNA-Viren. HPeV umfasst 19 Genotypen (HPeV1 bis HPeV19), wobei HPeV1 und HPeV3 die häufigsten sind<sup>(19,20)</sup>.

Bei HAdV-Infektionen, die die Atemwege betreffen, werden erkältungsähnliche Symptome mit Fieber, Halsschmerzen, Erbrechen und Durchfall oder schwere Verläufe mit Konjunktivitis und Lungenentzündung berichtet<sup>(3,7,8)</sup>. HBoV-Infektionen zeigen Keuchen und Husten als häufige Symptome. Beide Viren sind weltweit verbreitet und treten das ganze Jahr über auf, wobei HBoV in den Winter- und Frühlingsmonaten einen Höhepunkt hat<sup>(8,9)</sup>.

Bei HEV-Infektionen der Atemwege werden Symptome wie Husten, Atemnot, Keuchen und Fieber berichtet<sup>(14)</sup>. In gemäßigten Breiten treten HEV-Infektionen häufiger im Sommer und Herbst und in tropischen Regionen ganzjährig auf<sup>(13)</sup>. Rhinoviren sind weltweit verbreitet, mit einer höheren Prävalenz im Frühjahr und Herbst<sup>(12,15)</sup>. Sie werden häufig bei Patienten mit Pneumonie, Bronchiolitis oder Mittelohrentzündung gefunden und können mit oder ohne Co-Erreger auftreten. Rhinoviren verursachen Symptome wie Rhinorrhoe, Halsschmerzen, Husten, Kopfschmerzen, verstopfte Nase und Unwohlsein<sup>(15)</sup>. Häufige Symptome einer HPeV-Infektion sind einerseits Erkältungssymptome wie Schnupfen, Fieber und andererseits Husten<sup>(20,21,23)</sup>.

Meist verlaufen virale Atemwegsinfektionen dieser Viren selbstlimitierend oder asymptomatisch, aber besonders Kinder, ältere Menschen und immungeschwächte Patienten können von einem schwereren Krankheitsverlauf betroffen sein<sup>(7-9,14-16,19,22)</sup>.

### 3. Testprinzip

Der RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Test ist eine multiplex real-time RT- PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus RNA, Bocavirus DNA und Adenovirus DNA aus humanen Nasen-/ Rachenabstrichen.

Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus (5'UTR), Bocavirus (5'NTR) und Adenovirus (Hexon) amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Test enthält eine **Internal Control RNA** (ICR), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

### 4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung sind ausreichend für 100 Bestimmungen.

**Tab. 1:** Packungsinhalt

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µl	gelb, gebrauchsfertig
2	Enzyme Mix	1 ×	80 µl	rot, gebrauchsfertig
R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µl	braun, gebrauchsfertig
N	No Template Control	1 ×	450 µl	weiß, gebrauchsfertig
P	Positive Control	1 ×	200 µl	blau, gebrauchsfertig



## 5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Bitte folgen Sie den Handhabungsvorgaben in Tabelle 2 und lagern Sie das Kit unmittelbar nach Verwendung gemäß den aufgeführten Angaben.
- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

**Tab. 2:** Lagerungsbedingungen und -hinweise

	Lagertemperatur	Maximale Lagerzeit
ungeöffnet	-20 °C	Bis zum aufgedrucktem Verfallsdatum verwendungsfähig
geöffnet	-20 °C	20 Tau-/Frier-Zyklen

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 6.1 Reagenzien

Keine.

### 6.2 Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Durchführung des RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Tests benötigt:

Zubehör
Extraktionsplattform: MagNA Pure 96 Instrument (Roche)
Real-time PCR Gerät: LightCycler® 480 II (Roche)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm)
Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten (low profile, white wells, clear frame), Reaktionsgefäße, Folien)
Zentrifuge mit Rotor für Platten
Vortexer
Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
Pipettenspitzen mit Filtern
Puderfreie Einmalhandschuhe

Bei Fragen zur Verwendung von Geräten zur automatischen Abarbeitung wenden Sie sich bitte an die R-Biopharm AG unter [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro*-Diagnostik.

Dieser Test ist nur von qualifiziertem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.

Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.

In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken. Eine räumliche Trennung, gesonderte Kleidung und Instrumente für Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten um eine Querkontamination oder falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Vermeiden Sie eine Kontamination der Proben und der Komponenten des Kits mit Mikroben und Nukleasen (DNase / RNase).

Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.

Das Austauschen und Vermischen der Komponenten (Reaction Mix, Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, No Template Control) einer Kit-Charge mit den Komponenten einer anderen Charge ist untersagt.

Das Testkit darf nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details zum Safety Data Sheet (SDS) finden Sie unter der Artikelnummer auf <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Für Anwender in der Europäischen Union: Im Zusammenhang mit dem Produkt auftretende schwerwiegenden Vorfälle sind der R-Biopharm AG und der zuständigen nationalen Behörde zu melden.

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

### 8.1 DNA/RNA-Präparation aus Nasen- und Rachenabstrichen

Für die DNA/RNA-Präparation aus Nasen- und Rachenabstrichen wird das MagNA Pure 96 DNA/Viral NA SV Kit auf dem MagNa Pure 96 Instrument (Roche) empfohlen. Hierfür wird das Pathogen Universal 200 Protokoll verwendet und in 50 µl eluiert. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Test enthält eine **Internal Control RNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control RNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Prozesskontrolle (Extraktions- und Inhibitionskontrolle) eingesetzt werden.

Wird die **Internal Control RNA** nur als Inhibitionskontrolle für die Amplifikation verwendet, muss 1 µl der **Internal Control RNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control RNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle für die Amplifikation verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control RNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Nach Möglichkeit, wird empfohlen die interne Control RNA vor der Probenzugabe in die Proben-Cartridge vorzulegen. Es wird empfohlen je 1 µl pro Reaktion der **Internal Control RNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

## 9. Testdurchführung

### 9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, den **Enzyme Mix**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control RNA** auftauen, vortexen (ausgenommen Enzyme-Mix) und kurz zentrifugieren. Reagenzien sind während der Arbeitsschritte stets geeignet zu kühlen (2 – 8 °C).

**Tab. 3:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

**Tab. 4:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

## 9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Platten) pipettieren.

**Negativkontrolle:** Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Hinweis:** Es wird empfohlen bei Verwendung der **Internal Control RNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control RNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

**Proben:** Je 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Positivkontrolle:** Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Hinweis:** Es wird empfohlen bei Verwendung der **Internal Control RNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control RNA** zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6).

### 9.3 Geräteeinstellungen

#### 9.3.1 Universal real-time PCR-Profil

Zur Harmonisierung der RIDA®GENE Assays wurde der RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Assay im Universalprofil verifiziert. Das bietet die Möglichkeit DNA und RNA Assays miteinander zu kombinieren.

**Tab. 5:** Universal real-time PCR Profil für LightCycler® 480 II

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

#### 9.4 Detektionskanaleinstellung

**Tab. 6:** Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480 II	Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus/	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt</b>
	ICR	533/580	
	Bocavirus	533/610	
	Adenovirus	618/660	

## 10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 7).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

**Tab. 7:** Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * <sup>1</sup>	Siehe Certificate of Analysis
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

*\*<sup>1</sup> Ein Ct-Wert für die ICR ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.*

Wenn die Positivkontrolle nicht in dem angegebenen Ct-Bereich liegt, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm-Distributor.

## 11. Interpretation der Ergebnisse

**Tab. 8:** Interpretation der Ergebnisse\*

Nachweis von				
Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus	Bocavirus	Adenovirus	ICR	Ergebnis
+	-	-	+/-	Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus nachweisbar
-	+	-	+/-	Bocavirus nachweisbar
-	-	+	+/-	Adenovirus nachweisbar
+	+	-	+/-	Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus & Bocavirus nachweisbar
+	-	+	+/-	Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus & Adenovirus nachweisbar
-	+	+	+/-	Bocavirus & Adenovirus nachweisbar
+	+	+	+/-	Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus; Bocavirus & Adenovirus nachweisbar
-	-	-	+	Zielgene nicht nachweisbar
-	-	-	-	Ungültig

\* + = positiv  
- = negativ

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-RNA und die **Internal Control RNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control RNA** jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der **Internal Control RNA** ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der **Internal Control RNA** führen können.

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control RNA** jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der **Internal Control RNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-RNA und die **Internal Control RNA** keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf.



## 12. Grenzen der Methode

1. Der RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Test weist Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus RNA, Bocavirus DNA und Adenovirus DNA aus unbehandelten humanen Nasen-/ Rachenabstrichen nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des ermittelten Ct-Werts und dem Auftreten schwerer klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem vollständigen klinischen Bild zu interpretieren.
2. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
3. Dieser Test ist nur für Nasen-/ Rachenabstrichen validiert.
4. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
5. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro*-diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter der Nachweisgrenze (LoD 95 %) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE Pediatric Viral Panel zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
8. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus (5'UTR), Bocavirus (5'NTR) und Adenovirus (Hexon) vorhanden sind.
9. Die Substanzen Beclomethasondipropionat und Dihydrocodein können bereits in geringen Mengen interferierende Eigenschaften aufweisen. ratioAllerg® 50µg (Beclomethasondipropionat) führt ab einer Konzentration von 5 % [v/v] zu einem interferierenden Effekt auf den Nachweis von Adenovirus. Paracodin® N-Tropfen (Dihydrocodein) führen ab der geringsten getesteten Konzentration von 3,0 % [v/v] zu einem interferierenden Effekt auf den Nachweis von Enter-/Rhino-/Parechovirus und der Detektion der IC.
10. Dieser Assay sollte gemäß der GLP-Verordnung (Gute Laborpraxis) durchgeführt werden. Der Anwender muss bei der Durchführung des Tests die Anweisungen des Herstellers genau befolgen.

## 13. Leistungsmerkmale

### 13.1 Analytische Leistungsmerkmale

#### 13.1.1 Gerätenachweisgrenze

Zur Ermittlung der Gerätenachweisgrenze wurden 20 Replikate einer Kontrollprobe (50 Kopien/Reaktion (Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus/ Bocavirus / Adenovirus)) mit dem LightCycler® 480 II gemessen. Alle Replikate wurden positiv bestimmt.

Die Gerätenachweisgrenze liegt somit bei 50 Kopien/Reaktion.

#### 13.1.3 Analytische Spezifität

##### Interferierende Substanzen

Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren und interferierenden Substanzen kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen. Daher wurden die Auswirkungen verschiedener Substanzen, die aufgrund verbreiteter Anwendung bei Atemwegsinfektionen oder verbreitetem Vorkommen in den entsprechenden Proben (Nasen-/Rachenabstriche) vorliegen könnten, untersucht.

Substanzen, die möglicherweise die Testergebnisse signifikant beeinflussen könnten, wurden zunächst mit hohen Konzentrationen (dreifache Tagesdosis oder Simulation des „worst case“) in einem Interferenz-Screen untersucht. Wurde in diesem Interferenz-Screen bei einer untersuchten Substanz eine mögliche Interferenz festgestellt, wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Konzentration der betreffenden Substanz und der Interferenz hergestellt.

Für die in Tabelle 10 aufgeführten Substanzen wurden keine Interferenzen festgestellt

**Tab. 10:** Potentiell interferierende Substanzen

Potentiell interferierende Substanz	Konzentration
Amoxicillin-ratiopharm® 1000 mg Filmtabletten (Amoxicillin)	1 mg/ml
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg Filmtabletten (Azithromycin)	84 mg/ml
Humanblut	2 % [v/v]
Mucine	60 µg/ml
Nasenspray ratiopharm® (Xylometazolin)	10 % [v/v]
Natriumchlorid	10 % [v/v]
neo-angin® Spray (Benzydaminhydrochlorid)	10 % [v/v]
Oseltamivirphosphat	25 mg/ml
Paracetamol-ratiopharm® 500 mg Tabletten (Paracetamol)	10 mg/ml

Für die Substanzen ratioAllerg® 50µg (Beclomethasondipropionat) (5 % [v/v]) und Paracodin® N-Tropfen (Dihydrocodein) (3,0 % [v/v]) wurden inhibitorische Effekte beobachtet (siehe Grenzen der Methode).

### Kreuzreaktivität

Verschiedene Organismen (Bakterien, Viren, Pilze), die häufig in der Matrix Nasen-/Rachenabstrichen vorkommen können, wurden untersucht. Die Auswahl der zu untersuchenden Mikroorganismen für diesen Assay beruhte entweder darauf, dass diese natürlicherweise in der Matrix zu finden ist oder als respiratorische Erreger entsprechende Symptome hervorrufen. Für Analysen wurden Bakterien- (zwischen 10<sup>6</sup> und 10<sup>9</sup> CFU\*/ml), Pilz- oder Viruskulturen, Überstände von Bakterien-, Pilz- oder Viruskulturen sowie LGC- und NIBSC-Standards der jeweiligen Organismen verwendet.

Die RIDA®GENE Pediatric Viral Panel multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus, Bocavirus und Adenovirus. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 11):

**Tab. 11:** Potentiell kreuzreaktive Organismen

Organismus	Testergebnis*		
	Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus	Bocavirus	Adenovirus
<i>Acinetobacter baumannii</i> strain 5377	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-
<i>Bordetella parapertussis</i> strain 12822	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Corynebacterium diphtheria</i>	-	-	-
Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-
Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	-	-
Herpes simplex virus 2 strain MS	-	-	-
Human Coronavirus 229E	-	-	-
Human Coronavirus OC43	-	-	-

Human Coronavirus SARS-CoV-2 (Isolate: Italy-INMI1)	-	-	-
MERS-CoV strain: Florida/USA-2 Saudi Arabia 2014	-	-	-
Human Cytomegalovirus	-	-	-
Human Metapneumovirus	-	-	-
Human parainfluenza virus 1 strain C35	-	-	-
Human parainfluenza virus 2 strain Greer	-	-	-
Parainfluenza virus serotype 3	-	-	-
Parainfluenza virus 4a strain M-25	-	-	-
Human respiratory syncytial virus strain Long	-	-	-
Human respiratory syncytial virus strain 9320	-	-	-
Influenza A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	-	-	-
Influenza A/Victoria/2570/2019 (H1N1)	-	-	-
Influenza B/Washington/02/2019	-	-	-
Influenza B/Phuket/3073/2013 (Yamagata-Linie)	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MGH78578	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> strain FH od Eaton Agent	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> strain FAM18	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain NCTC 7465	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	-	-

- = negativ

### 13.1.4 Präzision

Die Präzision des RIDA®GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR Tests wurde für folgende Betrachtungsebenen ermittelt.

*Intra-Assay* Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben mit je 20 Replikaten auf dem LightCycler® 480 II unter identischen Bedingungen.

*Inter-Assay* Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben in 20 Läufen in Duplikaten an 10 Arbeitstagen (2 Läufe pro Tag) von zwei unterschiedlichen Operatoren unter reproduzierbaren Bedingungen.

Die Testungen zur *Intra-* und *Inter-Assay* Präzision erfolgten mit drei unterschiedlichen Lots.

Die Präzisionsdaten wurden mit fünf Kontrollproben, sowie der Assay zugehörigen PTC und der NTC ermittelt.

Der höchste erhaltene Variationskoeffizient der jeweiligen Messungen mit dem RIDA®GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR Test auf dem LightCycler® 480 II lag bei 3,16 %.

**Tab. 12:** Ergebnisse der Präzision des RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Tests für Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus.

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	31,0	30,6	30,9	31,9	31,9	31,6
	VK (%)	1,11 %	1,49 %	0,75 %	2,09 %	2,43 %	2,06 %
3	Ct	32,0	31,9	31,8	33,3	32,8	33,0
	VK (%)	1,22 %	1,29 %	1,19 %	2,04 %	2,50 %	1,91 %
4	Ct	22,8	22,8	22,5	23,9	23,7	23,7
	VK (%)	1,12 %	0,96 %	0,91 %	2,87 %	3,16 %	2,45 %
5	Ct	26,1	25,9	26,2	27,2	26,9	27,0
	VK (%)	0,83 %	0,83 %	0,78 %	2,12 %	2,00 %	2,19 %

**Tab. 13:** Ergebnisse der Präzision des RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Tests für Bocavirus.

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter- Lot</i>
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	30,5	30,5	30,5	30,9	30,9	30,8
	VK (%)	0,91 %	0,67 %	0,70 %	1,25 %	1,03 %	1,16 %
3	Ct	31,4	31,5	31,6	32,2	32,1	32,2
	VK (%)	0,91 %	0,77 %	1,15 %	1,24 %	1,43 %	1,83 %
4	Ct	22,5	23,0	22,6	23,5	23,4	23,4
	VK (%)	1,03 %	0,76 %	0,53 %	1,26 %	1,66 %	1,56 %
5	Ct	25,7	25,7	26,2	26,5	26,5	26,6
	VK (%)	0,69 %	0,49 %	0,74 %	1,17 %	1,15 %	0,96 %

**Tab. 14:** Ergebnisse der Präzision des RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Tests für Adenovirus.

Ct- Mittelwert / VK	<i>Intra-Assay</i>			<i>Inter-Assay</i>			<i>Inter-Lot</i>
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	31,1	31,3	31,3	31,7	31,8	31,8
	VK (%)	1,15 %	1,08 %	1,38 %	1,50 %	1,51 %	1,09 %
3	Ct	32,7	32,5	32,4	33,0	32,9	33,0
	VK (%)	0,87 %	0,80 %	1,11 %	2,05 %	1,39 %	1,66 %
4	Ct	23,7	23,9	23,6	24,3	24,4	24,4
	VK (%)	1,05 %	0,77 %	0,65 %	1,98 %	1,46 %	1,69 %
5	Ct	27,1	26,8	27,4	27,3	27,4	27,5
	VK (%)	0,93 %	0,83 %	0,68 %	1,85 %	1,65 %	1,23 %

### 13.1.5 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des RIDA®GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR Tests wurde an einem definierten Panel an Viren-Stämmen/Subtypen untersucht (s. Tab. 15).

**Tab. 15:** Analytische Reaktivitätstestung

Stamm	Konzentration	Ergebnis*		
		Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus	Bocavirus	Adenovirus
Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71 (subgroup C)	1 x 10 <sup>-5</sup> µg/ml	-	-	+
Adenovirus 40, human, strain Dugan (subgroup F)	1,26 U/ml	-	-	+
Adenovirus 41, human, strain Tak (subgroup F)	1,17 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-	-	+
Adenovirus Type 2 (subgroup C)	8,51 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	-	-	+
Adenovirus Type 3 (subgroup B)	1 x 10 <sup>3,23</sup> U/ml	-	-	+
Adenovirus Type 4 (subgroup E)	1,41 U/ml	-	-	+
Adenovirus Type: 11 (subgroup B)	1 x 10 <sup>0,29</sup> U/ml	-	-	+
Adenovirus Type: 31 (subgroup A)	1 x 10 <sup>0,15</sup> U/ml	-	-	+
Adenovirus Type: 37 (subgroup D)	1 x 10 <sup>-1,98</sup> U/ml	-	-	+
Adenovirus Type: 5 Stock strain: N/A (subgroup C)	1:100	-	-	+
Adenovirus Type: 7A (subgroup B)	1 x 10 <sup>3,06</sup> U/ml	-	-	+
Bocavirus, HBoV1	1:10 <sup>6</sup>	-	+	-
Enterovirus A – Coxsackievirus A2, strain Fleetwood	1,51 x 10 <sup>2</sup> U/ml	+	-	-
Enterovirus A – Enterovirus Type 71, strain 2003 Isolate	4,57 TCID <sub>50</sub> /ml	+	-	-
Enterovirus B – Coxsackievirus B4	1 x 10 <sup>2,5</sup> U/ml	+	-	-
Enterovirus B – Echovirus 11	5,89 x 10 <sup>1</sup> U/ml	+	-	-



Enterovirus C – Coxsackievirus A21, strain Kuykendall	1 x 10 <sup>3,29</sup> U/ml	+	-	-
Enterovirus C – Coxsackievirus A24, strain DN-19	1:10 <sup>4</sup>	+	-	-
Enterovirus D – Enterovirus Type 68, strain 2007 isolate	1,26 x 10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	+	-	-
Enterovirus D – Enterovirus Type 70, strain J670/71	1:10 <sup>5</sup>	+	-	-
Parechovirus Type 1, strain Harris	3,39 x 10 <sup>4</sup> U/ml	+	-	-
Parechovirus Type 3	4,07 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	+	-	-
Rhinovirus Type 1A	4,17 x 10 <sup>1</sup> U/ml	+	-	-
Rhinovirus A16	1,26 x 10 <sup>2</sup> U/ml	+	-	-
Rhinovirus A80	1,17 x 10 <sup>1</sup> U/ml	+	-	-
Rhinovirus B14	1,05 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	+	-	-
Rhinovirus B42	2,45 x 10 <sup>2</sup> U/ml	+	-	-
Rhinovirus B70	1,70 x 10 <sup>2</sup> U/ml	+	-	-

\*+ = positiv (mindestens 2 von 3 Replikaten positiv)










- = negative

## 14. Versionsübersicht






Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2022-03-03	Freigabeversion

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

### Testspezifische Symbole

	Reaktions-Mix
	Enzyme-Mix
	Extraktions-/Inhibitionskontrolle
	Negativkontrolle
	Positivkontrolle

## 16. Literatur

1. Brini I, Guerrero A, Hannachi N, Bouguila J, Orth-Höller D, Bouhlel A, u. a. Epidemiology and clinical profile of pathogens responsible for the hospitalization of children in Sousse area, Tunisia. *PloS One*. 2017;12(11):e0188325.
2. Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. Oktober 2018;24(10):1055–63.
3. Ma X, Conrad T, Alchikh M, Reiche J, Schweiger B, Rath B. Can we distinguish respiratory viral infections based on clinical features? A prospective pediatric cohort compared to systematic literature review. *Rev Med Virol*. September 2018;28(5):e1997.
4. Mummidi PS, Tripathy R, Dwibedi B, Mahapatra A, Baraha S. Viral aetiology of wheezing in children under five. *Indian J Med Res*. Februar 2017;145(2):189–93.
5. Sonawane AA, Shastri J, Bavdekar SB. Respiratory Pathogens in Infants Diagnosed with Acute Lower Respiratory Tract Infection in a Tertiary Care Hospital of Western India Using Multiplex Real Time PCR. *Indian J Pediatr*. Mai 2019;86(5):433–8.
6. PERCH study group (The Pneumonia Etiology Research for Child Health Study Group). Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study. *Lancet Lond Engl*. 31. August 2019;394(10200):757–79.
7. Robert-Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 22/2019. 29. Mai 2019;6.
8. Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. *Microbiol Spectr*. August 2016;4(4).
9. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, u. a. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 21. Oktober 2016;22(39):8684–97.
10. Christensen A, Kesti O, Elenius V, Eskola AL, Døllner H, Altunbulakli C, u. a. Human bocaviruses and paediatric infections. *Lancet Child Adolesc Health*. Juni 2019;3(6):418–26.
11. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol*. Januar 2012;22(1):46–64.
12. Greenberg SB. Update on rhinovirus and coronavirus infections. *Semin Respir Crit Care Med*. August 2011;32(4):433–46.
13. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol*. Januar 2015;235(2):217–28.
14. Messacar K, Abzug MJ, Dominguez SR. The Emergence of Enterovirus-D68. *Microbiol Spectr*. Juni 2016;4(3).

15. To KKW, Yip CCY, Yuen K-Y. Rhinovirus - From bench to bedside. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*. Juli 2017;116(7):496–504.
16. Hayes A, Nguyen D, Andersson M, Antón A, Bailly J-L, Beard S, u. a. A European multicentre evaluation of detection and typing methods for human enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *J Med Virol*. August 2020;92(8):1065–74.
17. Simonen-Tikka M-L, Klemola P, Suomenrinne S, Kajjalainen S, Söderström D, Savolainen-Kopra C, u. a. Virus infections among young children--the first year of the INDIS study. *J Med Virol*. September 2013;85(9):1678–84.
18. Cox DW, Le Souëf PN. Rhinovirus and the developing lung. *Paediatr Respir Rev*. September 2014;15(3):268–74.
19. Chen B-C, Chang J-T, Huang T-S, Chen J-J, Chen Y-S, Jan M-W, u. a. Parechovirus A Detection by a Comprehensive Approach in a Clinical Laboratory. *Viruses*. 12. Dezember 2018;10(12).
20. McNeale D, Wang CYT, Arden KE, Mackay IM. HPeV-3 predominated among Parechovirus A positive infants during an outbreak in 2013-2014 in Queensland, Australia. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2018;98:28–32.
21. Piralla A, Furione M, Rovida F, Marchi A, Stronati M, Gerna G, u. a. Human parechovirus infections in patients admitted to hospital in Northern Italy, 2008-2010. *J Med Virol*. April 2012;84(4):686–90.
22. Sillanpää S, Oikarinen S, Sipilä M, Seppälä E, Nurminen N, Rautiainen M, u. a. Human parechovirus as a minor cause of acute otitis media in children. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2015;62:106–9.
23. Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, u. a. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. September



# RIDA®GENE Pediatric Viral Panel

**REF** PG PG4725

## 1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. The RIDA®GENE Pediatric Viral Panel test, performed on the LightCycler® 480 II real-time PCR instrument, is a multiplex real-time RT-PCR for the direct qualitative detection and differentiation of rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus RNA, bocavirus DNA, and adenovirus DNA in untreated human nasal/throat swabs from people with signs and symptoms of a respiratory infection.

The RIDA®GENE Pediatric Viral Panel test is intended to support the differential diagnosis of rhinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus, and adenovirus infections in patients with symptoms of a respiratory infection in connection with other clinical and laboratory findings.

Negative results do not rule out infection with rhinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus, or adenovirus and should not be used as the sole basis for diagnosis.

The product is intended for professional use.

## 2. Summary and explanation of the test

Viral respiratory tract infections are one of the primary causes of hospitalizations and clinic visits in children and older people.<sup>(1-6)</sup> In addition to the known respiratory viruses like influenza and SARS-CoV-2, adenoviruses, bocaviruses, enteroviruses, parechoviruses, and rhinoviruses can cause respiratory tract infections.

Human adenoviruses (HAdVs) belong to the family Adenoviridae and the genus Mastadenovirus. They are icosahedron-shaped, nonenveloped, double-stranded DNA viruses with a diameter of 65 to 110 nm. They are divided into seven species, (A to G), which comprise about 67 serotypes.<sup>(7,8)</sup>

Human bocaviruses (HBoVs) are icosahedral, small, nonenveloped parvoviruses.<sup>(9-11)</sup> They are about 18 nm to 26 nm in diameter and have single-stranded DNA with a genome size of 4 kb to 6 kb (plus terminal sequences of 32 to 52 nucleotides). The role of HBoVs as harmless passengers is still contentiously debated because they are often isolated in combination with other pathogens. HBoVs comprise four subtypes: HBoV1, HBoV2, HBoV3, and HBoV4.<sup>(9,10)</sup>

Enteroviruses and rhinoviruses are single-stranded, icosahedral, nonenveloped RNA viruses that have a genome size of about 7.2 kb.<sup>(12-15)</sup> Before molecular tools were

introduced to classify pathogens, rhinoviruses and enteroviruses were considered to be two very different pathogens.<sup>(15)</sup> Today, we know that they are genetically related to one another. They both belong to the genus Enterovirus within the family Picornaviridae.<sup>(13-17)</sup> Human enteroviruses (HEVs) comprise four species, HEV-A, HEV-B, HEV-C, and HEV-D, with more than 200 different serotypes. Rhinoviruses are divided into three species, rhinovirus A, rhinovirus B, and rhinovirus C, which comprise about 150 different types.<sup>(12-18)</sup> Like enteroviruses and rhinoviruses, human parechoviruses (HPeVs) belong to the family Picornaviridae, but they are classified under the genus Parechovirus.<sup>(16,17,19-22)</sup> HPeVs are single-stranded, nonenveloped RNA viruses. HPeVs comprise 19 genotypes (HPeV1 to HPeV19), whereas HPeV1 and HPeV3 are the most common.<sup>(19,20)</sup>

HAdV infections that affect the respiratory tracts are reported with common cold-like symptoms including fever, sore throat, vomiting, and diarrhea, and severe infections are reported with conjunctivitis and lung inflammation.<sup>(3,7,8)</sup> HBoV infections induce wheezing and cough as common symptoms. Both viruses are distributed worldwide and occur throughout the year, whereas HBoV reaches a peak in the winter and spring months.<sup>(8,9)</sup>

Reported symptoms of HEV respiratory tract infections include cough, shortness of breath, wheezing, and fever.<sup>(14)</sup> HEV infections are more common in the summer and fall in temperate climates and occur throughout the year in tropical regions.<sup>(13)</sup>

Rhinoviruses are distributed worldwide, with higher prevalence in spring and fall.<sup>(12,15)</sup> They occur commonly in patients with pneumonia, bronchiolitis, or an infection of the middle ear and can occur with or without copathogens. Rhinoviruses cause symptoms like rhinorrhea, sore throat, cough, headache, nasal congestion, and malaise.<sup>(15)</sup> Common symptoms of an HPeV infection are common cold symptoms such as stuffy nose and fever as well as cough.<sup>(20,21,23)</sup>

Usually viral respiratory infections with these viruses are self limiting or asymptomatic, but especially children, older people, and patients with immunodeficiency can be affected by a severe disease.<sup>(7-9,14-16,19,22)</sup>

### 3. Test principle

The RIDA<sup>®</sup>GENE Pediatric Viral Panel test is a multiplex real-time RT-PCR for the direct qualitative detection and differentiation of rhinovirus/enterovirus/parechovirus RNA, bocavirus DNA, and adenovirus DNA in human nasal/throat swabs.

After DNA isolation, (if present) the specific gene fragments of rhinovirus/enterovirus/parechovirus (5'UTR), bocavirus (5'NTR), and adenovirus (hexon) are amplified. The amplified target sequences are detected using hydrolysis probes that are labeled with a quencher at one end and a fluorescent reporter dye (fluorophore) at the other. The probes hybridize to the amplicon in the presence of a target sequence. During extension, **Taq-Polymerase** separates the reporter from the quencher. The reporter emits a fluorescent signal that is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescent signal increases with the quantity of formed amplicons. The RIDA<sup>®</sup>GENE Pediatric Viral Panel test contains an **Internal Control RNA** (ICR) to be able to control sample preparation and/or any potential PCR inhibition.

### 4. Reagents provided

The reagents in the kit are sufficient for 100 determinations.

**Table 1:** Reagents provided

Kit code	Reagent	Amount		Lid color
1	<b>Reaction Mix</b>	2 ×	1050 µL	yellow, ready for use
2	<b>Enzyme Mix</b>	1 ×	80 µL	red, ready for use
R	<b>Internal Control RNA</b>	2 ×	1700 µL	brown, ready for use
N	<b>No Template Control</b>	1 ×	450 µL	white, ready for use
P	<b>Positive Control</b>	1 ×	200 µL	blue, ready for use



## 5. Storage instructions

- Please follow the handling guidelines in Table 2 and store the kit directly after use according to the information specified.
- All reagents must be stored away from light at -20 °C and, if unopened, can be used until the expiration date printed on the label. After the expiration date, the quality guarantee is no longer valid.
- All reagents should be carefully thawed prior to use (e.g., in a refrigerator at 2 °C - 8 °C).
- Repeated freezing/thawing of up to 20 times does not have an impact on the test property (if necessary, create aliquots after the first thaw and refreeze reagents immediately).
- Cool all reagents appropriately during PCR preparation (2 °C - 8 °C).

**Table 2:** Storage conditions and information

	Storage temperature	Maximum storage time
unopened	-20 °C	Can be used until the printed expiration date
opened	-20 °C	20 freeze-thaw cycles

## 6. Reagents required but not provided

### 6.1 Reagents

None.

### 6.2 Laboratory equipment

The following equipment is needed for performing the RIDA®GENE Pediatric Viral Panel test:

Equipment
Extraction platform: MagNA Pure 96 instrument (Roche)
Real-time PCR instrument: LightCycler® 480 II (Roche)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm)
Real-time PCR consumables (plates (low profile, white wells, clear frame), reaction vials, films)
Centrifuge with rotor for plates
Vortexer
Pipettes (0.5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Pipette tips with filters
Powder-free disposable gloves

For questions on the use of equipment for automated processing, please contact R-Biopharm AG at [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Warnings and precautions for the users

For *in vitro* diagnostic use only.

This test must be carried out only by qualified laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories must be followed.

Always adhere strictly to the operating manual when carrying out this test.

Do not pipette samples or reagents using your mouth. Avoid contact with broken skin and mucous membranes.

Wear personal protective equipment (appropriate gloves, lab coat, safety glasses) when handling reagents and samples, and wash hands after completing the test.

Do not smoke, eat, or drink in areas where samples are handled.

Separate rooms, special clothing, and instruments for extraction, PCR preparation, and PCR must be used to prevent cross-contamination and false-positive results.

Avoid contaminating the samples and components of the kit with microbes and nucleases (DNase/RNase).

Clinical samples must be viewed as potentially infectious and must be disposed of appropriately, like all reagents and materials that come into contact with potentially infectious samples.

Do not exchange or mix the components (Reaction Mix, Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, No Template Control) from one kit lot with the components of another lot.

Do not use the kit after the expiration date. Users are responsible for the proper disposal of all reagents and materials after use. For disposal, please adhere to national regulations.

Further details on the Safety Data Sheet (SDS) can be found under the item number at <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

For users in the European Union: Report all serious adverse events associated with the product to R-Biopharm AG and the appropriate national authorities.

## 8. Collection and storage of samples

### 8.1 DNA/RNA preparation from nasal and throat swabs

For DNA/RNA preparation from nasal and throat swabs, the MagNA Pure 96 DNA/Viral NA SV Kit on the MagNA Pure 96 instrument (Roche) is recommended. For this, use the Pathogen Universal 200 protocol and elute in 50 µL. The manufacturer's instructions must be observed.

The RIDA®GENE Pediatric Viral Panel test contains an **Internal Control RNA** that indicates potential PCR inhibition, checks the integrity of the reagents, and confirms successful nucleic acid extraction. The **Internal Control RNA** can be used either solely as an inhibition control or as a process control (extraction and inhibition control).

When the **Internal Control RNA** is used only as an inhibition control for amplification, 1 µL of the **Internal Control RNA** must be added to the Master Mix (see Table 4).

When the **Internal Control RNA** is used as an extraction control for sample preparation **and** as an inhibition control for amplification, then 20 µL of the **Internal Control RNA** must be used during extraction. It is recommended, if possible, to add the Internal Control RNA to the sample cartridge before adding the sample. It is recommended to pipette 1 µL of the **Internal Control RNA** per reaction into the PCR mix of the negative control and of the positive control.

## 9. Test procedure

### 9.1 Preparation of the Master Mix

The total number of the reactions needed for PCR (samples and control reactions) must be calculated. One positive control and one negative control must be included in each test run.

Adding an additional 10 % volume to the Master Mix is recommended in order to compensate for any pipetting loss (see Table 3, Table 4). Prior to use, thaw the **Reaction Mix**, the **Enzyme Mix**, the **Positive Control**, the **No Template Control**, and the **Internal Control RNA**, vortex (except for the enzyme mix), and centrifuge for a short time. Reagents must always be cooled appropriately during the work steps (2 °C - 8 °C).

**Table 3:** Example of the calculation and preparation of the Master Mix for 10 reactions (ICR as extraction and inhibition control)

Kit code	Components of the Master Mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19.3 µL	212.3 µL
2	<b>Enzyme Mix</b>	0.7 µL	7.7 µL
	<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

Mix the Master Mix and then centrifuge for short time.

**Table 4:** Example of the calculation and preparation of the Master Mix for 10 reactions (ICR only as inhibition control)

Kit code	Components of the Master Mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19.3 µL	212.3 µL
2	<b>Enzyme Mix</b>	0.7 µL	7.7 µL
R	<b>Internal Control RNA</b>	1.0 µL	11 µL
	<b>Total</b>	<b>21.0 µL</b>	<b>231.0 µL</b>

Mix the Master Mix and then centrifuge for short time.

## 9.2 Preparation of the PCR mix

Pipette 20 µL of the Master Mix into each reaction vial (plates).

**Negative control:** Add 5 µL of the **No Template Control** to each pre-pipetted Master Mix.

**Note:** When the **Internal Control RNA** is used as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control, it is recommended to add 1 µL of the **Internal Control RNA** to each PCR mix of the negative control.

**Samples:** Add 5 µL eluate to each pre-pipetted Master Mix.

**Positive control:** Add 5 µL of the **Positive Control** to each pre-pipetted Master Mix.

**Note:** When the **Internal Control RNA** is used as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control, it is recommended to add 1 µL of the **Internal Control RNA** to each PCR mix of the positive control.

Seal the plates, briefly centrifuge at slow speed, and transfer to the real-time PCR instrument. Start PCR according to PCR instrument setup (see Table 5, Table 6).

## 9.3 PCR instrument setup

### 9.3.1 Universal real-time PCR profile

To harmonize the RIDA®GENE assays, the RIDA®GENE Pediatric Viral Panel assay was verified in the universal profile. This makes it possible to combine DNA and RNA assays with each other.

**Table 5:** Universal real-time PCR profile for LightCycler® 480 II

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/extension	15 sec, 60 °C
Temperature transition rate/ ramp rate	Maximum

**Note:** Annealing and extension take place in the same step.

## 9.4 Detection channel setting

**Table 6:** Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR instrument	Detection	Detection channel	Comment
Roche LightCycler® 480 II	Rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required.</b>
	ICR	533/580	
	Bocavirus	533/610	
	Adenovirus	618/660	

## 10. Quality control - indication of instability or expiration of reagents

Samples are evaluated using the analysis software of the real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions. Negative and positive controls must show the correct results (see Table 7).

The **Positive Control** is present in a concentration of  $10^3$  copies/ $\mu$ L. It is used in a total quantity of  $5 \times 10^3$  copies in every PCR run.

**Table 7:** A valid PCR run must meet the following conditions:

Sample	Result	ICR Ct	Target gene Ct
Positive control	Positive	N/A *1	See Certificate of Analysis
Negative control	Negative	Ct > 20	0

\*1 A Ct value for the ICR is not needed to obtain a positive result of the positive control.

If the positive control is not within the specified Ct range but the negative control is valid, all reactions need to be reanalyzed, including the controls.

If the negative control is not negative, but the positive control is valid, all reactions need to be reanalyzed, including the controls.

If the specified values are not met, check the following items before repeating the test:

- Expiration date of the reagents used
- Functionality of the equipment being used
- Correct test procedure

If the conditions are still not fulfilled after repeating the test, please consult the manufacturer or your local R-Biopharm distributor.

## 11. Result interpretation

**Table 8:** Result interpretation\*

Detection of				
Rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus	Bocavirus	Adenovirus	ICR	Result
+	-	-	+/-	Rhinovirus/enterovirus/ parechovirus detectable
-	+	-	+/-	Bocavirus detectable
-	-	+	+/-	Adenovirus detectable
+	+	-	+/-	Rhinovirus/enterovirus/ parechovirus & bocavirus detectable
+	-	+	+/-	Rhinovirus/enterovirus/ parechovirus & adenovirus detectable
-	+	+	+/-	Bocavirus & adenovirus detectable
+	+	+	+/-	Rhinovirus/enterovirus/ parechovirus; bocavirus & adenovirus detectable
-	-	-	+	Target genes not detectable
-	-	-	-	Invalid

\* + = positive  
- = negative

A sample is positive if the sample RNA and the **Internal Control RNA** show an amplification signal in the detection system.

A sample is also positive if the sample RNA shows an amplification signal, but no amplification signal can be seen for the **Internal Control RNA** in the detection system. Detecting the **Internal Control RNA** is not necessary in this case because high amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the **Internal Control RNA**.

A sample is negative if the sample RNA does not show an amplification signal, but an amplification signal is visible for the **Internal Control RNA** in the detection system. Inhibition of the PCR reaction can be ruled out by the detection of the **Internal Control RNA**.

A sample is invalid if the sample RNA and the **Internal Control RNA** do not show an amplification signal in the detection system. PCR inhibitors are present in the sample or an error occurred during the extraction process.



## 12. Limitations of the method

1. The RIDA<sup>®</sup>GENE Pediatric Viral Panel test detects rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus RNA, bocavirus DNA, and adenovirus DNA in untreated human nasal/throat swabs. A connection between the level of the determined Ct value and the occurrence of severe clinical symptoms cannot be derived from this. The results obtained must always be interpreted in combination with the complete clinical symptoms.
2. The diagnosis should not be based on the result of the molecular biological analysis alone, but should always take the patient's medical history and symptoms into account.
3. This test is validated only for nasal/throat swabs.
4. Improper sampling, transport, storage, and handling, or a pathogen load below the test's analytical sensitivity can lead to false-negative results.
5. The presence of PCR inhibitors can lead to false-negative or invalid results.
6. As with all PCR-based *in vitro* diagnostic tests, extremely low concentrations of the target sequences which are under the limit of detection (LoD 95 %) can be detected. The results obtained are not always reproducible.
7. Mutations or polymorphisms in the primer or probe binding sites can interfere with the detection of new or unknown variants and can lead to false-negative results using the RIDA<sup>®</sup>GENE Pediatric Viral Panel.
8. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. A positive result indicates that the target genes (rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus (5'UTR), bocavirus (5'NTR), and adenovirus (hexon)) are present.
9. The substances beclomethasone dipropionate and dihydrocodeine can have interfering properties even in low amounts. Starting at a concentration of 5 % [v/v], ratioAllerg<sup>®</sup> 50 µg (beclomethasone dipropionate) has an interfering effect on the detection of adenovirus. Paracodin<sup>®</sup> N drops (dihydrocodeine) have an interfering effect on the detection of enterovirus/rhinovirus/parechovirus and the detection of the IC starting at the lowest tested concentration of 3.0 % [v/v].
10. This assay should be performed in compliance with the regulation on good laboratory practice (GLP). Users must precisely follow the manufacturer's instructions when performing the test.

## 13. Performance characteristics

### 13.1 Analytical performance characteristics

#### 13.1.1 Device detection limit

For determining the device detection limit, 20 replicates of a control sample (50 copies/reaction (rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus, bocavirus, adenovirus)) were measured on LightCycler® 480 II. All replicates were positive.

The device detection limit is therefore 50 copies/reaction.

#### 13.1.3 Analytical specificity

##### Interfering substances

The presence of PCR inhibitors and interfering substances can lead to false-negative or invalid results. Therefore, the effects of various substances that could be present given their widespread use in respiratory infections or their widespread occurrence in the corresponding samples (nasal/throat swabs) were investigated.

Substances that could potentially significantly influence the test results were examined initially at high concentrations (triple the daily dose or simulation of the worst case) in an interference screen. If a potential interference was found in this interference screen for an examined substance, a dose-effect relationship was established between the concentration of the substance in question and the interference.

No interference was found for the substances listed in Table 10.

**Table 10:** Potentially interfering substances

Potentially interfering substance	Concentration
Amoxicillin-ratiopharm® 1000 mg film-coated tablets (amoxicillin)	1 mg/mL
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg film-coated tablets (azithromycin)	84 mg/mL
Human blood	2 % [v/v]
Mucins	60 µg/mL
Nasenspray-ratiopharm® nasal spray (xylometazoline)	10 % [v/v]
Sodium chloride	10 % [v/v]
Neo-angin® spray (benzylamine hydrochloride)	10 % [v/v]
Oseltamivir phosphate	25 mg/mL
Paracetamol-ratiopharm® 500 mg tablets (paracetamol)	10 mg/mL

Inhibitory effects were observed for the substances ratioAllerg® 50 µg (beclomethasone dipropionate) (5 % [v/v]) and Paracodin® N drops (dihydrocodeine) (3.0 % [v/v]) (see Limitations of the method).

### Cross-reactivity

Various organisms (bacteria, viruses, fungi) that are commonly found in the matrix of nasal/throat swabs were investigated. The microorganisms to be investigated for this assay were chosen because either they naturally occur in the matrix or they cause corresponding symptoms as respiratory pathogens. Bacterial cultures (between 10<sup>6</sup> and 10<sup>9</sup> CFU\*/mL); fungal or viral cultures; supernatants of bacterial fungal, or viral cultures; and LGC and NIBSC standards of the particular organisms were used for the analyses.

The RIDA®GENE Pediatric Viral Panel multiplex real-time RT-PCR is specific for rhinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus, and adenovirus. No cross-reactivities with the following species were detected (see Table 11):

**Table 11:** Potentially cross-reactive organisms

Organism	Test result*		
	Rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus	Bocavirus	Adenovirus
<i>Acinetobacter baumannii</i> strain 5377	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-
<i>Bordetella parapertussis</i> strain 12822	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	-	-
Epstein-Barr virus strain B95-8	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-
Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	-	-
Herpes simplex virus 2 strain MS	-	-	-
Human coronavirus 229E	-	-	-
Human coronavirus OC43	-	-	-

Human coronavirus SARS-CoV-2 (isolate: Italy-INMI1)	-	-	-
MERS-CoV strain: Florida/USA-2 Saudi Arabia 2014	-	-	-
Human cytomegalovirus	-	-	-
Human metapneumovirus	-	-	-
Human parainfluenza virus 1 strain C35	-	-	-
Human parainfluenza virus 2 strain Greer	-	-	-
Parainfluenza virus serotype 3	-	-	-
Parainfluenza virus 4a strain M-25	-	-	-
Human respiratory syncytial virus strain long	-	-	-
Human respiratory syncytial virus strain 9320	-	-	-
Influenza A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	-	-	-
Influenza A/Victoria/2570/2019 (H1N1)	-	-	-
Influenza B/Washington/02/2019	-	-	-
Influenza B/Phuket/3073/2013 (Yamagata lineage)	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MGH 78578	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> strain FH of Eaton Agent	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> strain FAM18	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain NCTC 7465	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	-	-

- = negative

### 13.1.4 Precision

The precision of the RIDA®GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR test was determined for the following levels of consideration.

*Intra-assay* precision: Determination of 5 control samples using 20 replicates each on LightCycler® 480 II under identical conditions.

*Inter-assay* precision: Determination of 5 control samples in 20 runs in duplicate on 10 work days (2 runs per day) performed by two different technicians under reproducible conditions.

Testing for *intra-* and *inter-assay* precision was carried out using three different lots.

The precision data were obtained using five control samples, as well as the PTC and NTC belonging to the assay.

The maximum obtained coefficient of variation of the measurements with the RIDA®GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR test on the LightCycler® 480 II was 3.16 %.

**Table 12:** Results of the precision of the RIDA®GENE Pediatric Viral Panel test for rhinovirus/enterovirus/parechovirus.

Ct mean value/CV	<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>			<i>Inter-lot</i>	
	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lots 1–3	
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	31.0	30.6	30.9	31.9	31.9	31.6	31.8
	CV (%)	1.11 %	1.49 %	0.75 %	2.09 %	2.43 %	2.06 %	2.23 %
3	Ct	32.0	31.9	31.8	33.3	32.8	33.0	33.0
	CV (%)	1.22 %	1.29 %	1.19 %	2.04 %	2.50 %	1.91 %	2.26 %
4	Ct	22.8	22.8	22.5	23.9	23.7	23.7	23.8
	CV (%)	1.12 %	0.96 %	0.91 %	2.87 %	3.16 %	2.45 %	2.84 %
5	Ct	26.1	25.9	26.2	27.2	26.9	27.0	27.1
	CV (%)	0.83 %	0.83 %	0.78 %	2.12 %	2.00 %	2.19 %	2.13 %

**Table 13:** Results of the precision of the RIDA®GENE Pediatric Viral Panel test for bocavirus.

Ct mean value/CV		<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>			<i>Inter-lot</i>
		Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lots 1–3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	30.5	30.5	30.5	30.9	30.9	30.8	30.9
	CV (%)	0.91 %	0.67 %	0.70 %	1.25 %	1.03 %	1.16 %	1.16 %
3	Ct	31.4	31.5	31.6	32.2	32.1	32.2	32.2
	CV (%)	0.91 %	0.77 %	1.15 %	1.24 %	1.43 %	1.83 %	1.52 %
4	Ct	22.5	23.0	22.6	23.5	23.4	23.4	23.4
	CV (%)	1.03 %	0.76 %	0.53 %	1.26 %	1.66 %	1.56 %	1.50 %
5	Ct	25.7	25.7	26.2	26.5	26.5	26.6	26.5
	CV (%)	0.69 %	0.49 %	0.74 %	1.17 %	1.15 %	0.96 %	1.10 %

**Table 14:** Results of the precision of the RIDA®GENE Pediatric Viral Panel test for adenovirus.

Ct mean value/CV	<i>Intra-assay</i>			<i>Inter-assay</i>			<i>Inter-lot</i>	
	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lot 1	Kit lot 2	Kit lot 3	Kit lots 1–3	
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	31.1	31.3	31.3	31.7	31.8	31.8	31.7
	CV (%)	1.15 %	1.08 %	1.38 %	1.50 %	1.51 %	1.09 %	1.38 %
3	Ct	32.7	32.5	32.4	33.0	32.9	33.0	33.0
	CV (%)	0.87 %	0.80 %	1.11 %	2.05 %	1.39 %	1.66 %	1.72 %
4	Ct	23.7	23.9	23.6	24.3	24.4	24.4	24.4
	CV (%)	1.05 %	0.77 %	0.65 %	1.98 %	1.46 %	1.69 %	1.72 %
5	Ct	27.1	26.8	27.4	27.3	27.4	27.5	27.4
	CV (%)	0.93 %	0.83 %	0.68 %	1.85 %	1.65 %	1.23 %	1.62 %

### 13.1.5 Analytical reactivity

The reactivity of the RIDA<sup>®</sup>GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR test was examined on a defined panel of virus strains/subtypes (see Table 15).

**Table 15:** Analytical reactivity testing

Strain	Concentration	Result*		
		Rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus	Bocavirus	Adenovirus
Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71 (subgroup C)	1 x 10 <sup>-5</sup> µg/mL	-	-	+
Adenovirus 40, human, strain Dugan (subgroup F)	1.26 U/mL	-	-	+
Adenovirus 41, human, strain Tak (subgroup F)	1.17 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adenovirus type 2 (subgroup C)	8.51 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adenovirus type 3 (subgroup B)	1 x 10 <sup>3.23</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus type 4 (subgroup E)	1.41 U/mL	-	-	+
Adenovirus type 11 (subgroup B)	1 x 10 <sup>0.29</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus type 31 (subgroup A)	1 x 10 <sup>0.15</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus type 37 (subgroup D)	1 x 10 <sup>-1.98</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus type 5 stock strain N/A (subgroup C)	1:100	-	-	+
Adenovirus type 7A (subgroup B)	1 x 10 <sup>3.06</sup> U/mL	-	-	+
Bocavirus, HBoV1	1:10 <sup>6</sup>	-	+	-
Enterovirus A - coxsackievirus A2, strain Fleetwood	1.51 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus A - enterovirus type 71, strain 2003 isolate	4.57 TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Enterovirus B - coxsackievirus B4	1 x 10 <sup>2.5</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus B - echovirus 11	5.89 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus C - coxsackievirus A21, strain Kuykendall	1 x 10 <sup>3.29</sup> U/mL	+	-	-



Enterovirus C - coxsackievirus A24, strain DN-19	1:10 <sup>4</sup>	+	-	-
Enterovirus D - enterovirus type 68, strain 2007 isolate	1.26 x 10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Enterovirus D - enterovirus type 70, strain J670/71	1:10 <sup>5</sup>	+	-	-
Parechovirus type 1, strain Harris	3.39 x 10 <sup>4</sup> U/mL	+	-	-
Parechovirus type 3	4.07 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rhinovirus type 1A	4.17 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus A16	1.26 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus A80	1.17 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus B14	1.05 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rhinovirus B42	2.45 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus B70	1.70 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-

\*+ = positive (at least 2 of 3 replicates positive)










- = negative

## 14. Version history






Version number	Section and designation
2022-03-03	Release version

## 15. Explanation of symbols

### General symbols

	For <i>in vitro</i> diagnostic use
	Observe operating manual
	Batch number
	Use before
	Storage temperature
	Item number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

### Test-specific symbols

	Reaction Mix
	Enzyme Mix
	Extraction/inhibition control
	Negative control
	Positive control

## 16. References

1. Brini I, Guerrero A, Hannachi N, Bouguila J, Orth-Höller D, Bouhleb A, u. a. Epidemiology and clinical profile of pathogens responsible for the hospitalization of children in Sousse area, Tunisia. *PloS One*. 2017;12(11):e0188325.
2. Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. Oktober 2018;24(10):1055-63.
3. Ma X, Conrad T, Alchikh M, Reiche J, Schweiger B, Rath B. Can we distinguish respiratory viral infections based on clinical features? A prospective pediatric cohort compared to systematic literature review. *Rev Med Virol*. September 2018;28(5):e1997.
4. Mummidi PS, Tripathy R, Dwibedi B, Mahapatra A, Baraha S. Viral aetiology of wheezing in children under five. *Indian J Med Res*. Februar 2017;145(2):189-93.
5. Sonawane AA, Shastri J, Bavdekar SB. Respiratory Pathogens in Infants Diagnosed with Acute Lower Respiratory Tract Infection in a Tertiary Care Hospital of Western India Using Multiplex Real Time PCR. *Indian J Pediatr*. Mai 2019;86(5):433-8.
6. PERCH study group (The Pneumonia Etiology Research for Child Health Study Group). Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study. *Lancet Lond Engl*. 31. August 2019;394(10200):757-79.
7. Robert-Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 22/2019. 29. Mai 2019;6.
8. Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. *Microbiol Spectr*. August 2016;4(4).
9. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, u. a. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 21. Oktober 2016;22(39):8684-97.
10. Christensen A, Kesti O, Elenius V, Eskola AL, Døllner H, Altunbulakli C, u. a. Human bocaviruses and paediatric infections. *Lancet Child Adolesc Health*. Juni 2019;3(6):418-26.
11. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol*. Januar 2012;22(1):46-64.
12. Greenberg SB. Update on rhinovirus and coronavirus infections. *Semin Respir Crit Care Med*. August 2011;32(4):433-46.
13. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol*. Januar 2015;235(2):217-28.
14. Messacar K, Abzug MJ, Dominguez SR. The Emergence of Enterovirus-D68. *Microbiol Spectr*. Juni 2016;4(3).
15. To KKW, Yip CCY, Yuen K-Y. Rhinovirus - From bench to bedside. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*. Juli 2017;116(7):496-504.
16. Hayes A, Nguyen D, Andersson M, Antón A, Bailly J-L, Beard S, u. a. A European multicentre evaluation of detection and typing methods for human

- enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *J Med Virol*. August 2020;92(8):1065-74.
17. Simonen-Tikka M-L, Klemola P, Suomenrinne S, Kaijalainen S, Söderström D, Savolainen-Kopra C, u. a. Virus infections among young children--the first year of the INDIS study. *J Med Virol*. September 2013;85(9):1678-84.
  18. Cox DW, Le Souëf PN. Rhinovirus and the developing lung. *Paediatr Respir Rev*. September 2014;15(3):268-74.
  19. Chen B-C, Chang J-T, Huang T-S, Chen J-J, Chen Y-S, Jan M-W, u. a. Parechovirus A Detection by a Comprehensive Approach in a Clinical Laboratory. *Viruses*. 12. Dezember 2018;10(12).
  20. McNeale D, Wang CYT, Arden KE, Mackay IM. HPeV-3 predominated among Parechovirus A positive infants during an outbreak in 2013-2014 in Queensland, Australia. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2018;98:28-32.
  21. Piralla A, Furione M, Rovida F, Marchi A, Stronati M, Gerna G, u. a. Human parechovirus infections in patients admitted to hospital in Northern Italy, 2008-2010. *J Med Virol*. April 2012;84(4):686-90.
  22. Sillanpää S, Oikarinen S, Sipilä M, Seppälä E, Nurminen N, Rautiainen M, u. a. Human parechovirus as a minor cause of acute otitis media in children. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2015;62:106-9.
  23. Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, u. a. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. September



# RIDA®GENE Pediatric Viral Panel

**REF** PG4725

## 1. Uso previsto

Para uso diagnóstico *in vitro*. El ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel, realizado en el equipo de PCR en tiempo real LightCycler® 480 II, es una prueba de RT-PCR múltiple en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de ARN de rinovirus/enterovirus/parecovirus, ADN de bocavirus y ADN de adenovirus en frotis nasofaríngeos humanos no tratados de personas con signos y síntomas de infección respiratoria.

El ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel está destinado a utilizarse en el diagnóstico diferencial de infecciones por rinovirus/enterovirus/parecovirus, bocavirus y adenovirus en pacientes con síntomas de infección respiratoria en combinación con otros hallazgos clínicos y resultados de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por rinovirus/enterovirus/parecovirus, bocavirus o adenovirus y no deben utilizarse como único fundamento del diagnóstico.

El producto está destinado a un uso profesional.

## 2. Resumen y descripción del ensayo

Las infecciones víricas de las vías respiratorias son una de las principales causas de hospitalización y consulta médica en niños y ancianos.<sup>(1-6)</sup> Además de los virus respiratorios conocidos, como el virus de la gripe y el SARS-CoV-2, también los adenovirus, bocavirus, enterovirus, parecovirus y rinovirus pueden provocar infecciones de las vías respiratorias.

Los adenovirus humanos (HAdV) pertenecen a la familia Adenoviridae y al género *Mastadenovirus*. Son virus de ADN bicatenario icosaédricos y sin envoltura, con un diámetro de 65 nm a 110 nm. Se dividen en siete especies (A-G), que comprenden alrededor de 67 serotipos.<sup>(7,8)</sup>

Los bocavirus humanos (HBoV) son parvovirus icosaédricos, pequeños y sin envoltura.<sup>(9-11)</sup> Tienen aproximadamente un diámetro de 18 nm a 26 nm y contienen ADN monocatenario, con un genoma de 4 kb a 6 kb de tamaño (más secuencias terminales de 32 a 52 nucleótidos). El papel de los HBoV como agentes inocuos sigue siendo controvertido, ya que con frecuencia se aíslan en combinación con

otros patógenos. Los HBoV constan de cuatro subtipos: HBoV1, HBoV2, HBoV3 y HBoV4.<sup>(9,10)</sup>

Los enterovirus y los rinovirus son virus de ARN monocatenario icosaédricos y sin envoltura, con un genoma de aproximadamente 7,2 kb de tamaño.<sup>(12-15)</sup> Antes de la introducción de herramientas moleculares para la clasificación de los patógenos, los rinovirus y los enterovirus se consideraban dos patógenos muy diferentes.<sup>(15)</sup> En cambio, hoy sabemos que están genéticamente relacionados entre sí. Ambos pertenecen al género *Enterovirus*, de la familia Picornaviridae.<sup>(13-17)</sup> Los enterovirus humanos (HEV) comprenden cuatro especies (HEV-A, HEV-B, HEV-C y HEV-D), con más de 200 serotipos diferentes. Los rinovirus se dividen en tres especies (rinovirus A, rinovirus B y rinovirus C), que abarcan alrededor de 150 tipos diferentes.<sup>(12-18)</sup> Al igual que los enterovirus y los rinovirus, los parecovirus humanos (HPeV) pertenecen a la familia Picornaviridae, pero se clasifican en el género *Parechovirus*.<sup>(16, 17, 19-22)</sup> Los HPeV son virus de ARN monocatenario sin envoltura. Los HPeV comprenden 19 genotipos (de HPeV1 a HPeV19), aunque el HPeV1 y el HPeV3 son los más frecuentes.<sup>(19, 20)</sup>

Las infecciones por HAdV que afectan a las vías respiratorias ññ se notifican habitualmente con síntomas parecidos a los del resfriado común, como fiebre, dolor de garganta, vómitos y diarrea, y en los casos de infección grave ññ suelen comunicarse conjuntivitis e inflamación pulmonar.<sup>(3, 7, 8)</sup> En las infecciones por HBoV, son síntomas frecuentes las sibilancias y la tos. Ambos virus están distribuidos por todo el mundo y no tienen un comportamiento estacional, mientras que los HBoV alcanzan un máximo en los meses de invierno y primavera.<sup>(8, 9)</sup>

Los síntomas de infección de las vías respiratorias por HEV que se ññ notifican habitualmente son tos, disnea, sibilancias y fiebre.<sup>(14)</sup> Las infecciones por HEV son más frecuentes en verano y otoño en climas templados y se producen durante todo el año en las regiones tropicales.<sup>(13)</sup> Los rinovirus están distribuidos por todo el mundo y presentan una mayor prevalencia en primavera y otoño.<sup>(12, 15)</sup> Suelen afectar a pacientes con neumonía, bronquiolitis o infección del oído medio y pueden estar o no acompañados de copatógenos. Los rinovirus provocan síntomas como rinorrea, dolor de garganta, tos, cefalea, congestión nasal y malestar general.<sup>(15)</sup> Los síntomas frecuentes de una infección por HPeV son síntomas propios del resfriado común, como congestión nasal y fiebre y también tos.<sup>(20, 21, 23)</sup>

Generalmente, las infecciones respiratorias víricas causadas por estos virus son autolimitadas o asintomáticas, pero especialmente en niños, ancianos y pacientes con inmunodeficiencia pueden ññ revestir carácter de gravedad.<sup>(7-9, 14-16, 19, 22)</sup>

### 3. Principio del ensayo

El ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel es una prueba de RT-PCR múltiple en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de ARN de rinovirus/enterovirus/parecovirus, ADN de bocavirus y ADN de adenovirus en frotis nasofaríngeos humanos.

Después del aislamiento del ADN (si está presente), se amplifican los fragmentos génicos específicos de rinovirus/enterovirus/parecovirus (UTR 5'), bocavirus (NTR 5') y adenovirus (hexona). Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis marcadas con un extintor de fluorescencia en un extremo y un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la **Taq-Polymerase** separa el indicador del extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta con la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel contiene un **Internal Control DNA** (ICD) que permite someter a control la preparación de las muestras y/o cualquier posible inhibición de la PCR.

### 4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones.

**Tabla 1:** Reactivos suministrados

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	amarillo, listo para usar.
2	Enzyme Mix	1 ×	80 µL	rojo, listo para usar.
R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µL	marrón, listo para usar.
N	No Template Control	1 ×	450 µL	blanco, listo para usar.
P	Positive Control	1 ×	200 µL	azul, listo para usar.



## 5. Instrucciones de almacenamiento

- Siga las directrices de manipulación indicadas en la tabla 2 y guarde el kit inmediatamente después de utilizarlo, de acuerdo con la información especificada.
- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz y a una temperatura de -20 °C. En caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad deja de ser válida.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a una temperatura de 2 - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que las propiedades del ensayo se vean afectadas (si es necesario, prepare alícuotas tras la primera descongelación y vuelva a congelar los reactivos de inmediato).
- Refrigere todos los reactivos adecuadamente durante la preparación de la PCR (2 - 8 °C).

**Tabla 2:** Condiciones de almacenamiento e información

	Temperatura de conservación	Tiempo máximo de almacenamiento
sin abrir	-20 °C	Puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada.
abierto	-20 °C	20 ciclos de congelación y descongelación

## 6. Reactivos necesarios no suministrados

### 6.1 Reactivos

Ninguno.

### 6.2 Equipo de laboratorio

Para realizar el ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel se requieren los siguientes equipos:

Equipos
Plataforma de extracción: Equipo MagNA Pure 96 (Roche)
Equipo de PCR en tiempo real: LightCycler® 480 II (Roche)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm)
Consumibles para PCR en tiempo real (placas [perfil bajo, pocillos blancos, marco transparente], viales de reacción, película de sellado)
Centrífuga con rotor para placas
Vórtex
Pipetas (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Puntas de pipeta con filtros
Guantes desechables sin talco

Si tiene alguna pregunta sobre el uso de equipos para el procesamiento automatizado, póngase en contacto con R-Biopharm AG escribiendo a [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo debe llevarlo a cabo únicamente personal de laboratorio cualificado.

Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.

Siga siempre estrictamente el manual de instrucciones al realizar este ensayo.

No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.

Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.

No fume, ni coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.

Deben utilizarse salas diferentes, ropa especial y equipos para la extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha para evitar la contaminación cruzada y la obtención de resultados falsos positivos.

Evite contaminar las muestras y los componentes del kit con microorganismos y nucleasas (ADNasa/ARNasa).

Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.

No intercambie ni mezcle los componentes (Reaction Mix, Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, No Template Control) de un lote de un kit con los componentes de otro lote.

No utilice el kit después de la fecha de caducidad. Los usuarios son responsables de desechar de manera correcta todos los reactivos y materiales una vez utilizados.

Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Puede obtener más información en la ficha de datos de seguridad (SDS) de cada artículo en: <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para los usuarios de la Unión Europea: Deben notificarse todos los efectos adversos graves relacionados con el producto a R-Biopharm AG y a las autoridades nacionales competentes.

## 8. Obtención y almacenamiento de muestras

### 8.1 Preparación de ADN/ARN a partir de frotis nasofaríngeos

Para la preparación de ADN/ARN a partir de frotis nasofaríngeos, se recomienda usar el MagNA Pure 96 DNA/Viral NA SV Kit en el equipo MagNA Pure 96 (Roche). Para ello, utilice el protocolo Pathogen Universal 200 y eluya en 50 µL. Deben seguirse las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel contiene un **Internal Control RNA** que indica la posible inhibición de la PCR, comprueba la integridad de los reactivos y confirma la extracción correcta de los ácidos nucleicos.

El **Internal Control RNA** puede utilizarse ya sea únicamente como control de inhibición o como control de proceso (control de extracción e inhibición).

Cuando el **Internal Control RNA** se usa únicamente como control de inhibición para la amplificación, se debe añadir 1 µL de **Internal Control RNA** a la mezcla maestra (véase la tabla 4).

Cuando el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción para la preparación de las muestras **y** como control de inhibición para la amplificación, se deben añadir 20 µL de **Internal Control RNA** durante la extracción. Se recomienda añadir el Internal Control RNA al cartucho de la muestra antes de añadir esta, si es posible. Se recomienda pipetear 1 µL del **Internal Control RNA** por reacción a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

## 9. Procedimiento del ensayo

### 9.1 Preparación de la mezcla maestra

Debe calcularse el número total de reacciones (reacciones de muestras y de control) necesarias para la PCR. En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda añadir un volumen adicional del 10 % a la mezcla maestra para compensar las pérdidas por pipeteo (véanse las tablas 3 y 4). Antes de utilizarlos, descongele la **Reaction Mix**, la **Enzyme Mix**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control RNA**, agítelos en un vórtex (excepto la mezcla de enzimas) y centrifúguelos brevemente. Los reactivos deben estar siempre debidamente refrigerados durante los pasos del procedimiento (2 - 8 °C).

**Tabla 3:** Ejemplo del cálculo y la preparación de la mezcla maestra para 10 reacciones (ICR como control de extracción e inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más un 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µL	212,3 µL
2	Enzyme Mix	0,7 µL	7,7 µL
	<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

Mezcle la mezcla maestra y centrifúguela brevemente.

**Tabla 4:** Ejemplo del cálculo y la preparación de la mezcla maestra para 10 reacciones (ICR solo como control de inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más un 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µL	212,3 µL
2	Enzyme Mix	0,7 µL	7,7 µL
R	Internal Control RNA	1,0 µL	11 µL
	<b>Total</b>	<b>21,0 µL</b>	<b>231,0 µL</b>

Mezcle la mezcla maestra y centrifúguela brevemente.

## 9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (placas).

**Control negativo:** Añada 5 µL del **No Template Control** a cada mezcla maestra pipeteada previamente.

**Nota:** Cuando el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición, se recomienda añadir 1 µL de **Internal Control RNA** a cada mezcla de PCR del control negativo.

**Muestras** Añada 5 µL de eluido a cada mezcla maestra pipeteada previamente.

**Control positivo:** Añada 5 µL de **Positive Control** a cada mezcla maestra pipeteada previamente.

**Nota:** Cuando el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición, se recomienda añadir 1 µL de **Internal Control RNA** a cada mezcla de PCR del control positivo.

Selle las placas, centrifúguelas brevemente a baja velocidad y colóquelas en el equipo de PCR en tiempo real. Inicie la PCR de acuerdo con la configuración del equipo de PCR (véanse las tablas 5 y 6).

## 9.3 Configuración del equipo de PCR

### 9.3.1 Perfil universal de PCR en tiempo real

Para armonizar los ensayos RIDA®GENE, el ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel se ha verificado en el perfil universal. Esto permite combinar los ensayos de ADN y ARN entre sí.

**Tabla 5:** Perfil universal de PCR en tiempo real para el LightCycler® 480 II

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Máximo

**Nota:** La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

## 9.4 Configuración del canal de detección

**Tabla 6:** Selección de canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Comentarios
Roche LightCycler® 480 II	Rinovirus/ enterovirus/ parecovirus	465/510	<b>Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).</b>
	ICR	533/580	
	Bocavirus	533/610	
	Adenovirus	618/660	

## 10. Control de calidad: indicación de inestabilidad o caducidad de los reactivos

Las muestras se evalúan mediante el software de análisis del equipo de PCR en tiempo real, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los controles negativo y positivo deben mostrar los resultados correctos (véase la tabla 7).

El **Positive Control** está presente en una concentración de  $10^3$  copias/ $\mu$ L. Se utiliza en una cantidad total de  $5 \times 10^3$  copias en cada sesión de PCR.

**Tabla 7:** Una sesión de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado	Ct del ICR	Ct de los genes diana
Control positivo	Positivo	N/A *1	Véase el certificado de análisis
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

\*1 No se requiere un valor de Ct para el ICR para obtener un resultado positivo del control positivo.

Si el control positivo no se sitúa en el intervalo de Ct especificado pero el control negativo es válido, deben volverse a procesar todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, deben volverse a procesar todas las reacciones, incluidos los controles.

Si los valores especificados no se cumplen, compruebe lo siguiente antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados
- Correcta realización del procedimiento de ensayo

Si las condiciones tampoco se cumplen después de repetir el ensayo, consulte al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

## 11. Interpretación de los resultados

**Tabla 8:** Interpretación de los resultados\*

Detección de			ICR	Resultado
Rinovirus/ enterovirus/ parecovirus	Bocavirus	Adenovirus		
+	-	-	+/-	Rinovirus/enterovirus/ parecovirus detectables
-	+	-	+/-	Bocavirus detectable
-	-	+	+/-	Adenovirus detectable
+	+	-	+/-	Rinovirus/enterovirus/ parecovirus y bocavirus detectables
+	-	+	+/-	Rinovirus/enterovirus/ parecovirus y adenovirus detectables
-	+	+	+/-	Bocavirus y adenovirus detectables
+	+	+	+/-	Rinovirus/enterovirus/ parecovirus, bocavirus y adenovirus detectables
-	-	-	+	Genes diana no detectables
-	-	-	-	No válido

\* + = positivo  
- = negativo

Una muestra es positiva si el ARN de la muestra y el **Internal Control RNA** presentan una señal de amplificación en el sistema de detección.

Una muestra también es positiva si el ARN de la muestra presenta señal de amplificación pero no se observa ninguna señal de amplificación para el **Internal Control RNA** en el sistema de detección. La detección del **Internal Control RNA** no es necesaria en este caso debido a que unas concentraciones elevadas de amplicón pueden generar una señal débil o no generar señal para el **Internal Control RNA**.

Una muestra es negativa si el ARN de la muestra no presenta señal de amplificación pero se observa una señal de amplificación para el **Internal Control RNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede descartar por la detección del **Internal Control RNA**.



Una muestra no es válida si el ARN de la muestra y el Internal Control RNA no presentan señal de amplificación en el sistema de detección. Hay inhibidores de la PCR en la muestra o se ha producido un error durante el proceso de extracción.

## 12. Limitaciones del método

1. El ensayo RIDA<sup>®</sup>GENE Pediatric Viral Panel detecta ARN de rinovirus/ enterovirus/ parecovirus, ADN de bocavirus y ADN de adenovirus en frotis nasofaríngeos humanos no tratados. Este ensayo no permite deducir ninguna relación entre el valor de Ct determinado y la presencia de síntomas clínicos graves. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con todos los síntomas clínicos.
2. El diagnóstico no debe basarse únicamente en el resultado del ensayo de biología molecular, sino que siempre deben tenerse en cuenta la historia clínica y los síntomas del paciente.
3. Este ensayo está validado únicamente para frotis nasofaríngeos.
4. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de las muestras o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica del ensayo pueden dar lugar a resultados falsos negativos.
5. La presencia de inhibidores de la PCR puede producir resultados falsos negativos o no válidos.
6. Al igual que con todos los ensayos diagnósticos *in vitro* mediante PCR, pueden detectarse concentraciones extremadamente bajas de las secuencias diana, inferiores al límite de detección (LoD del 95 %). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
7. Las mutaciones o polimorfismos en el cebador o en los sitios de unión de la sonda pueden interferir con la detección de variantes nuevas o desconocidas y dar lugar a resultados falsos negativos al usar el RIDA<sup>®</sup>GENE Pediatric Viral Panel.
8. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Un resultado positivo indica que están presentes los genes diana (rinovirus/enterovirus/parecovirus [UTR 5'], bocavirus [NTR 5'] y adenovirus [hexona]).
9. El dipropionato de beclometasona y la dihidrocodeína son dos sustancias que pueden tener propiedades interferentes incluso en cantidades bajas. A partir de una concentración del 5 % (v/v), ratioAllerg<sup>®</sup> 50 µg (dipropionato de beclometasona) interfiere en la detección de adenovirus. Paracodina<sup>®</sup> N gotas (dihidrocodeína) interfiere en la detección de enterovirus/rinovirus/parecovirus y del IC a partir de un 3,0 % (v/v), la concentración más baja estudiada.
10. Este ensayo debe realizarse siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (BPL). Los usuarios deben seguir estrictamente las instrucciones del fabricante al realizar el ensayo.

## **13. Características de rendimiento**

### **13.1 Características de rendimiento analítico**

#### **13.1.1 Límite de detección del equipo**

Para determinar el límite de detección del equipo, se analizaron 20 réplicas de una muestra de control (50 copias/reacción; rinovirus/enterovirus/parecovirus, bocavirus, adenovirus) en el LightCycler® 480 II. Todas las réplicas fueron positivas.

Por tanto, el límite de detección del equipo es de 50 copias/reacción.

#### **13.1.3 Especificidad analítica**

##### **Sustancias interferentes**

La presencia de inhibidores de la PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos. Así pues, se han estudiado los efectos de diferentes sustancias que podían estar presentes debido a su uso generalizado en las infecciones respiratorias o a su amplia presencia en las correspondientes muestras (frotis nasofaríngeos).

Las sustancias que podían influir significativamente en los resultados del ensayo se examinaron inicialmente a altas concentraciones (con el triple de la dosis diaria o una simulación del peor caso) mediante un cribado de interferencias. En caso de encontrar alguna sustancia potencialmente interferente durante el cribado de interferencias, se establecía una relación dosis-efecto entre la concentración de la sustancia en cuestión y la interferencia.

No se registraron interferencias con las sustancias indicadas en la tabla 10.

**Tabla 10:** Sustancias potencialmente interferentes

Sustancias potencialmente interferentes	Concentración
Amoxicilina ratiopharm® 1000 mg comprimidos recubiertos con película (amoxicilina)	1 mg/mL
Azitromicina ratiopharm® 500 mg comprimidos recubiertos con película (azitromicina)	84 mg/mL
Sangre humana	2% [v/v]
Mucinas	60 µg/mL
Nasenspray-ratiopharm® (xilometazolina, solución para pulverización nasal)	10 % [v/v]
Cloruro de sodio	10 % [v/v]
Neo-angin® (solución para pulverización) (clorhidrato de bencidamina)	10 % [v/v]
Fosfato de oseltamivir	25 mg/mL
Paracetamol-ratiopharm® 500 mg Tabletten (paracetamol, comprimidos)	10 mg/mL

Se observaron efectos inhibidores con las sustancias ratioAllerg® 50 µg (dipropionato de beclometasona) (5 % [v/v]) y Paracodina® N gotas (dihidrocodeína) (3,0 % [v/v]) (véase el apartado «Limitaciones del método»).

### Reactividad cruzada

Se estudiaron varios microorganismos (bacterias, virus, hongos) que suelen encontrarse en la matriz de los frotis nasofaríngeos. Los microorganismos estudiados para este ensayo se han elegido porque están presentes de forma natural en la matriz o bien porque causan los síntomas correspondientes como patógenos respiratorios. Para los análisis se utilizaron cultivos bacterianos (entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>9</sup> CFU\*/mL), cultivos fúngicos o víricos, sobrenadantes de cultivos bacterianos, fúngicos o víricos, y estándares LGC o NIBSC de los microorganismos en cuestión.

El ensayo de RT-PCR múltiple en tiempo real RIDA®GENE Pediatric Viral Panel es específico para rinovirus/enterovirus/parecovirus, bocavirus y adenovirus. No se hallaron reactividades cruzadas con las siguientes especies (véase la tabla 11):

**Tabla 11:** Organismos con posible reactividad cruzada

Organismo	Resultado del ensayo*		
	Rinovirus/ enterovirus/ parecovirus	Bocavirus	Adenovirus
<i>Acinetobacter baumannii</i> , cepa 5377	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-
<i>Bordetella parapertussis</i> , cepa 12822	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> , Tohama 1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	-	-
Virus de Epstein-Barr, cepa B95-8	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-
Virus del herpes simple 1, cepa McIntyre	-	-	-
Virus del herpes simple 2, cepa MS	-	-	-
Coronavirus humano 229E	-	-	-
Coronavirus humano OC43	-	-	-
Coronavirus humano SARS-CoV-2 (aislado: Italy-INMI1)	-	-	-
Cepa del MERS-CoV: Florida/USA-2 Saudi Arabia 2014	-	-	-
Citomegalovirus humano	-	-	-
Metaneumovirus humano	-	-	-
Virus paragripal humano 1, cepa C35	-	-	-
Virus paragripal humano 2, cepa Greer	-	-	-
Virus paragripal, serotipo 3	-	-	-
Virus paragripal humano 4a, cepa M-25	-	-	-
Virus respiratorio sincitial humano, cepa Long	-	-	-
Virus respiratorio sincitial humano, cepa 9320	-	-	-
Gripe A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	-	-	-
Gripe A/Victoria/2570/2019 (H1N1)	-	-	-
Gripe B/Washington/02/2019	-	-	-

Gripe B/Phuket/3073/2013 (linaje Yamagata)	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , cepa MGH 78578	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> ssp. <i>pneumophila</i>	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , cepa FH de Eaton Agent	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> , cepa FAM18	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , cepa NCTC 7465	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	-	-

- = negativo

### 13.1.4 Precisión

Se ha determinado la precisión del ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para los siguientes ññ casos.

Precisión *intraensayo* Determinación de 5 muestras de control con 20 réplicas cada una en el LightCycler® 480 II en condiciones idénticas.

Precisión *interensayo* Determinación de 5 muestras de control en 20 ensayos por duplicado durante 10 días de trabajo (2 ensayos por día), realizados por dos técnicos diferentes en condiciones reproducibles.

Los ensayos de precisión *intraensayo* e *interensayo* se llevaron a cabo utilizando tres lotes diferentes.

Los datos de precisión se obtuvieron utilizando cinco muestras de control, así como el PTC y el NTC pertenecientes al ensayo.

El coeficiente máximo de variación de las mediciones realizadas con el ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA®GENE Pediatric Viral Panel en el LightCycler® 480 II fue del 3,16 %.

**Tabla 12:** Resultados de la precisión del ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para rinovirus/ enterovirus/ parecovirus.

Media del Ct y CV	<i>Intraensayo</i>			<i>Interensayo</i>			<i>Interlote</i>
	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	31,0	30,6	30,9	31,9	31,9	31,6
	CV (%)	1,11%	1,49 %	0,75 %	2,09 %	2,43 %	2,06 %
3	Ct	32,0	31,9	31,8	33,3	32,8	33,0
	CV (%)	1,22 %	1,29 %	1,19 %	2,04 %	2,50 %	1,91 %
4	Ct	22,8	22,8	22,5	23,9	23,7	23,7
	CV (%)	1,12 %	0,96 %	0,91 %	2,87 %	3,16 %	2,45 %
5	Ct	26,1	25,9	26,2	27,2	26,9	27,0
	CV (%)	0,83 %	0,83 %	0,78 %	2,12 %	2,00 %	2,19 %

**Tabla 13:** Resultados de la precisión del ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para bocavirus.

Media del Ct y CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	30,5	30,5	30,5	30,9	30,9	30,8	30,9
	CV (%)	0,91 %	0,67 %	0,70 %	1,25 %	1,03 %	1,16 %	1,16 %
3	Ct	31,4	31,5	31,6	32,2	32,1	32,2	32,2
	CV (%)	0,91 %	0,77 %	1,15 %	1,24 %	1,43 %	1,83 %	1,52 %
4	Ct	22,5	23,0	22,6	23,5	23,4	23,4	23,4
	CV (%)	1,03 %	0,76 %	0,53 %	1,26 %	1,66 %	1,56 %	1,50 %
5	Ct	25,7	25,7	26,2	26,5	26,5	26,6	26,5
	CV (%)	0,69 %	0,49 %	0,74 %	1,17 %	1,15 %	0,96 %	1,10 %

**Tabla 14:** Resultados de la precisión del ensayo RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para adenovirus.

Media del Ct y CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1 a 3 del kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	31,1	31,3	31,3	31,7	31,8	31,8	31,7
	CV (%)	1,15 %	1,08 %	1,38 %	1,50 %	1,51 %	1,09 %	1,38 %
3	Ct	32,7	32,5	32,4	33,0	32,9	33,0	33,0
	CV (%)	0,87 %	0,80 %	1,11%	2,05 %	1,39 %	1,66 %	1,72 %
4	Ct	23,7	23,9	23,6	24,3	24,4	24,4	24,4
	CV (%)	1,05 %	0,77 %	0,65 %	1,98 %	1,46 %	1,69 %	1,72 %
5	Ct	27,1	26,8	27,4	27,3	27,4	27,5	27,4
	CV (%)	0,93 %	0,83 %	0,68 %	1,85 %	1,65 %	1,23 %	1,62 %



### 13.1.5 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA® GENE Pediatric Viral Panel se examinó en un panel definido de cepas/subtipos de virus (véase la tabla 15).

**Tabla 15:** Pruebas de reactividad analítica

Cepa	Concentración	Resultado*		
		Rinovirus/ enterovirus/ parecovirus	Bocavirus	Adenovirus
Adenovirus 1, humano cepa Adenoid 71 (subgrupo C)	1 x 10 <sup>-5</sup> µg/mL	-	-	+
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan (subgrupo F)	1,26 U/mL	-	-	+
Adenovirus 41, humano, cepa Tak (subgrupo F)	1,17 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adenovirus tipo 2 (subgrupo C)	8,51 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adenovirus tipo 3 (subgrupo B)	1 x 10 <sup>3,23</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 4 (subgrupo E)	1,41 U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 11 (subgrupo B)	1 x 10 <sup>0,29</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 31 (subgrupo A)	1 x 10 <sup>0,15</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 37 (subgrupo D)	1 x 10 <sup>-1,98</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 5, cepa madre N/D (subgrupo C)	1:100	-	-	+
Adenovirus tipo 7A (subgrupo B)	1 x 10 <sup>3,06</sup> U/ml	-	-	+
Bocavirus, HBoV1	1:10 <sup>6</sup>	-	+	-
Enterovirus A, virus de Coxsackie A2 cepa Fleetwood	1,51 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus A, enterovirus tipo 71, cepa del aislado 2003	4,57 TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Enterovirus B, virus de Coxsackie B4	1 x 10 <sup>2,5</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus B, ecovirus 11	5,89 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-

Enterovirus C, virus de Coxsackie A21, cepa Kuykendall	$1 \times 10^{3,29}$ U/mL	+	-	-
Enterovirus C, virus de Coxsackie A24, cepa DN-19	1:10 <sup>4</sup>	+	-	-
Enterovirus D, enterovirus tipo 68, cepa del aislado 2007	$1,26 \times 10^2$ TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Enterovirus D, enterovirus tipo 70, cepa J670/71	1:10 <sup>5</sup>	+	-	-
Parecovirus tipo 1, cepa Harris	$3,39 \times 10^4$ U/mL	+	-	-
Parecovirus tipo 3	$4,07 \times 10^3$ TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rinovirus tipo 1A	$4,17 \times 10^1$ U/mL	+	-	-
Rinovirus A16	$1,26 \times 10^2$ U/mL	+	-	-
Rinovirus A80	$1,17 \times 10^1$ U/mL	+	-	-
Rinovirus B14	$1,05 \times 10^1$ TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rinovirus B42	$2,45 \times 10^2$ U/mL	+	-	-
Rinovirus B70	$1,70 \times 10^2$ U/mL	+	-	-

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










- = negativo

#### 14. Historial de versiones






Número de versión	Sección y designación
2022-03-03	Versión publicada

## 15. Significado de los símbolos

### Símbolos generales

	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Seguir el manual de instrucciones
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de conservación
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

### Símbolos específicos del ensayo

	Reaction Mix
	Enzyme Mix
	Control de extracción/inhibición
	Control negativo
	Control positivo

## 16. Bibliografía

1. Brini I, Guerrero A, Hannachi N, Bouguila J, Orth-Höller D, Bouhleb A, u. a. Epidemiology and clinical profile of pathogens responsible for the hospitalization of children in Sousse area, Tunisia. *PloS One*. 2017;12(11):e0188325.
2. Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. Oktober 2018;24(10):1055-63.
3. Ma X, Conrad T, Alchikh M, Reiche J, Schweiger B, Rath B. Can we distinguish respiratory viral infections based on clinical features? A prospective pediatric cohort compared to systematic literature review. *Rev Med Virol*. September 2018;28(5):e1997.
4. Mummidi PS, Tripathy R, Dwibedi B, Mahapatra A, Baraha S. Viral aetiology of wheezing in children under five. *Indian J Med Res*. Februar 2017;145(2):189-93.
5. Sonawane AA, Shastri J, Bavdekar SB. Respiratory Pathogens in Infants Diagnosed with Acute Lower Respiratory Tract Infection in a Tertiary Care Hospital of Western India Using Multiplex Real Time PCR. *Indian J Pediatr*. Mai 2019;86(5):433-8.
6. PERCH study group (The Pneumonia Etiology Research for Child Health Study Group). Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study. *Lancet Lond Engl*. 31. August 2019;394(10200):757-79.
7. Robert-Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 22/2019. 29. Mai 2019;6.
8. Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. *Microbiol Spectr*. August 2016;4(4).
9. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, u. a. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 21. Oktober 2016;22(39):8684-97.
10. Christensen A, Kesti O, Elenius V, Eskola AL, Døllner H, Altunbulakli C, u. a. Human bocaviruses and paediatric infections. *Lancet Child Adolesc Health*. Juni 2019;3(6):418-26.
11. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol*. Januar 2012;22(1):46-64.
12. Greenberg SB. Update on rhinovirus and coronavirus infections. *Semin Respir Crit Care Med*. August 2011;32(4):433-46.
13. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol*. Januar 2015;235(2):217-28.
14. Messacar K, Abzug MJ, Dominguez SR. The Emergence of Enterovirus-D68. *Microbiol Spectr*. Juni 2016;4(3).
15. To KKW, Yip CCY, Yuen K-Y. Rhinovirus - From bench to bedside. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*. Juli 2017;116(7):496-504.
16. Hayes A, Nguyen D, Andersson M, Antón A, Bailly J-L, Beard S, u. a. A European multicentre evaluation of detection and typing methods for human enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *J Med Virol*. August 2020;92(8):1065-74.

17. Simonen-Tikka M-L, Klemola P, Suomenrinne S, Kaijalainen S, Söderström D, Savolainen-Kopra C, u. a. Virus infections among young children--the first year of the INDIS study. *J Med Virol*. September 2013;85(9):1678-84.
18. Cox DW, Le Souëf PN. Rhinovirus and the developing lung. *Paediatr Respir Rev*. September 2014;15(3):268-74.
19. Chen B-C, Chang J-T, Huang T-S, Chen J-J, Chen Y-S, Jan M-W, u. a. Parechovirus A Detection by a Comprehensive Approach in a Clinical Laboratory. *Viruses*. 12. Dezember 2018;10(12).
20. McNeale D, Wang CYT, Arden KE, Mackay IM. HPeV-3 predominated among Parechovirus A positive infants during an outbreak in 2013-2014 in Queensland, Australia. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2018;98:28-32.
21. Piralla A, Furione M, Rovida F, Marchi A, Stronati M, Gerna G, u. a. Human parechovirus infections in patients admitted to hospital in Northern Italy, 2008-2010. *J Med Virol*. April 2012;84(4):686-90.
22. Sillanpää S, Oikarinen S, Sipilä M, Seppälä E, Nurminen N, Rautiainen M, u. a. Human parechovirus as a minor cause of acute otitis media in children. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2015;62:106-9.
23. Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, u. a. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. September

# RIDA®GENE Pediatric Viral Panel

**REF** PG4725

## 1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro* Le test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel test, réalisé avec l'instrument de PCR en temps réel LightCycler® 480 II est une RT-PCR pour la détection qualitative directe de la différenciation des ARN de rhinovirus/entérovirus/paréchovirus, des ADN de bocavirus et des ADN d'adénovirus dans les frottis nasopharyngés humains non traités de personnes présentant des signes et symptômes d'infection respiratoire.

Le test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel est conçu pour étayer le diagnostic différentiel d'infections par rhinovirus/entérovirus/paréchovirus, bocavirus et adénovirus chez des patients présentant des symptômes d'infection respiratoire conjointement à d'autres résultats cliniques et de laboratoire.

Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par rhinovirus/entérovirus/paréchovirus, bocavirus ou adénovirus et ne doivent pas être utilisés comme seule base de diagnostic.

Ce produit est destiné à un usage professionnel.

## 2. Résumé et explication du test

Les infections virales des voies respiratoires sont l'une des causes principales d'hospitalisation et de consultation en clinique chez les enfants et les personnes âgées.<sup>(1-6)</sup> En plus des virus respiratoires connus comme la grippe et le SARS-CoV-2, les adénovirus, les bocavirus, les entérovirus, les paréchovirus et les rhinovirus peuvent causer des infections des voies respiratoires.

Les adénovirus humains (HAdV) appartiennent à la famille des Adenoviridae et au genre Mastadenovirus. Ce sont des virus en forme d'icosaèdre, non enveloppés et à ADN double brin dont le diamètre est compris entre 65 nm et 110 nm. Ils sont divisés en 7 espèces (de A à G), qui comprennent 67 sérotypes.<sup>(7,8)</sup>

Les bocavirus humains (HBoV) sont des parvovirus icosaédriques, petits et non enveloppés.<sup>(9-11)</sup> Leur diamètre est d'environ 18 nm à 26 nm, ils ont un ADN simple brin et la taille de leur génome est comprise entre 4 kb et 6 kb (plus les séquences terminales de 32 à 52 nucléotides). Le rôle des HBoV en tant que passagers inoffensifs fait toujours l'objet de débats controversés car ils sont souvent isolés en

association à d'autres pathogènes. Les HBoV comprennent 4 sous-types : HBoV1, HBoV2, HBoV3 et HBoV4.<sup>(9,10)</sup>

Les entérovirus et les rhinovirus sont des virus isocédriques, non enveloppés et à ADN simple brin et la taille de leur génome est d'environ 7,2 kb.<sup>(12-15)</sup> Avant l'apparition des outils moléculaires pour classer les pathogènes, les rhinovirus et les entérovirus étaient considérés comme étant deux pathogènes très différents.<sup>(15)</sup> Nous savons aujourd'hui qu'ils sont liés sur le plan génétique. Ils appartiennent tous les deux au genre Enterovirus au sein de la famille des Picornaviridae.<sup>(13-17)</sup> Les entérovirus humains (HEV) comprennent 4 espèces (HEV-A, HEV-B, HEV-C et HEV-D), avec plus de 200 différents sérotypes. Les rhinovirus sont divisés en 3 espèces (rhinovirus A, rhinovirus B et rhinovirus C) qui comprennent environ 150 types différents.<sup>(12-18)</sup> Tout comme les entérovirus et les rhinovirus, les paréchévirus humains (HPeV) appartiennent à la famille des Picornaviridae, mais ils sont classifiés sous le genre Parechovirus.<sup>(16,17,19-22)</sup> Les HPeV sont des virus non enveloppés à ARN simple brin. Les HPeV comprennent 19 génotypes (HPeV1 à HPeV19) ; HPeV1 et HPeV3 sont les plus fréquents.<sup>(19,20)</sup>

Les infections par HAdV qui affectent les voies respiratoires sont signalées comme ayant des symptômes semblables à ceux du rhume, avec notamment de la fièvre, un mal de gorge, des vomissements et de la diarrhée, et les infections graves sont signalées en association avec une conjonctivite et une inflammation pulmonaire.<sup>(3,7,8)</sup> Les symptômes fréquents des infections par HBoV sont une respiration sifflante et une toux. Les deux virus sont présents dans le monde entier et tout au long de l'année, tandis que les HBoV connaissent un pic pendant les mois d'hiver et du printemps.<sup>(8,9)</sup>

Les symptômes signalés pour les infections par HEV des voies respiratoires comprennent la toux, l'essoufflement, la respiration sifflante et la fièvre.<sup>(14)</sup> Les infections par HEV sont plus fréquentes en été et à l'automne dans les climats tempérés et peuvent survenir toute l'année dans les régions tropicales.<sup>(13)</sup> Les rhinovirus sont présents dans le monde entier, et leur prévalence est plus élevée au printemps et à l'automne.<sup>(12,15)</sup> Ils sont fréquents chez les patients présentant une pneumonie, une bronchiolite, ou une infection de l'oreille moyenne, avec ou sans copathogènes. Les rhinovirus provoquent des symptômes tels que la rhinorrhée, le mal de gorge, la toux, le mal de tête, la congestion nasale et des malaises.<sup>(15)</sup> Les symptômes fréquents des infections par HPeV sont les symptômes du rhume comme la congestion nasale et la fièvre, ainsi que la toux.<sup>(20,21,23)</sup>

Habituellement, les infections virales respiratoires sont limitées ou asymptomatiques, mais chez les enfants, les personnes âgées et les patients immunodéprimés, elles peuvent causer une maladie grave.<sup>(7-9,14-16,19,22)</sup>

### 3. Principe du test

Le test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel est une RT-PCR multiplexe en temps réel pour la détection qualitative directe et la différenciation des ARN de rhinovirus/ entérovirus/ paréchovirus, des ADN de bocavirus et des ADN d'adénovirus dans les frottis nasopharyngés humains.

Après isolation de l'ADN, les fragments génétiques spécifiques de rhinovirus/entérovirus/paréchovirus (5'UTR), de bocavirus (5'NTR) et d'adénovirus (hexon) sont amplifiés (s'ils sont présents). Les séquences cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes d'hydrolyse qui sont marquées par un extincteur à une extrémité et par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore) à l'autre extrémité. Les sondes s'hybrident avec l'amplicon en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la Taq-Polymerase sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal fluorescent qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal fluorescent augmente avec la quantité d'amplicons formés. Le test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel contient un Internal Control DNA (ICD) pour contrôler la préparation de l'échantillon et/ou toute éventuelle inhibition de la PCR.

### 4. Contenu du paquet

Les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations.

Tableau 1 : Contenu du paquet

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du bouchon
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	jaune, prêt à l'emploi
2	Enzyme Mix	1 ×	80 µL	rouge, prêt à l'emploi
R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µL	brun, prêt à l'emploi
N	No Template Control	1 ×	450 µL	blanc, prêt à l'emploi
P	Positive Control	1 ×	200 µL	bleu, prêt à l'emploi



## 5. Instructions de conservation des réactifs

- Respecter les consignes de manipulation figurant dans le tableau 2 et stocker le kit directement après utilisation conformément aux instructions.
- Tous les réactifs doivent être conservés à -20 °C et à l'abri de la lumière et, s'ils ne sont pas ouverts, peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 °C - 8 °C).
- Il est possible de congeler/décongeler les produits jusqu'à 20 fois sans altérer la propriété du test (au besoin, créer des aliquotes après la première décongélation et recongeler immédiatement les réactifs).
- Refroidir correctement tous les réactifs pendant la préparation de la PCR (2 °C - 8 °C).

**Tableau 2** : Informations et conditions de conservation

	Température de conservation	Durée maximale de conservation
non ouvert	-20 °C	Utilisable jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette
ouvert	-20 °C	20 cycles de congélation-décongélation

## 6. Réactifs requis, mais non fournis

### 6.1 Réactifs

Aucun.

### 6.2 Matériel de laboratoire

Le matériel suivant est nécessaire pour réaliser le test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel :

Matériel
Plateforme d'extraction : Instrument MagNA Pure 96 (Roche)
Instrument de PCR en temps réel : LightCycler® 480 II (Roche)
Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) est nécessaire.
Consommables de PCR en temps réel (plaques [profil bas, puits blancs, support transparent], flacons de réaction, films)
Centrifugeuse avec rotor pour plaques
Agitateur-mélangeur vortex
Pipettes (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1 000 µL)
Pointes de pipettes dotées de filtres
Gants jetables non poudrés

Pour toute question concernant l'utilisation d'équipements pour le traitement automatisé, veuillez contacter R-Biopharm AG à l'adresse [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Mesures de précaution

Exclusivement réservé au diagnostic *in vitro*.

Ce test doit être réalisé uniquement par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.

Toujours respecter strictement le manuel d'utilisation lors de la réalisation du test.

Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec des plaies et des membranes muqueuses.

Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test.

Ne pas fumer, manger ou boire dans les zones de manipulation des échantillons.

Des pièces séparées, des vêtements spéciaux et des instruments pour l'extraction, la préparation de la PCR et la PCR doivent être utilisés pour éviter la contamination croisée et les résultats faux positifs.

Éviter de contaminer les échantillons et les composants du kit avec des microbes et des nucléases (DNase/RNase).

Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux, et doivent être éliminés comme il se doit.

Ne pas échanger ou mélanger les composants (Reaction Mix, Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, No Template Control) d'un lot d'un kit avec les composants d'un autre lot.

Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption. Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de l'élimination correcte de tous les réactifs et matériaux. Pour l'élimination, respecter les règlements nationaux.

De plus amples informations sur la Safety Data Sheet (SDS) sont disponibles sous le numéro d'article à l'adresse suivante <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Pour les utilisateurs de l'Union européenne : signaler tout événement indésirable grave associé au produit à R-Biopharm AG et aux autorités nationales compétentes.

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

### 8.1 Préparation de l'ADN/ARN à partir de frottis nasopharyngés

Pour la préparation de l'ADN/ARN à partir de frottis nasopharyngés, il est recommandé d'utiliser le kit MagNA Pure 96 DNA/Viral NA SV sur l'instrument MagNA Pure 96 (Roche). Pour ce faire, utiliser le protocole Pathogen Universal 200 et éluer dans 50 µL. Il convient de respecter les instructions du fabricant.

Le test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel comprend un **Internal Control DNA** qui indique une éventuelle inhibition de la PCR, vérifie l'intégrité des réactifs et confirme la réussite de l'extraction des acides nucléiques. Le **Internal Control DNA** peut être utilisé comme un contrôle de l'inhibition seule, ou comme un contrôle du processus (contrôle de l'inhibition et de l'extraction).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'inhibition seule pour l'amplification, il convient d'ajouter 1 µL du **Internal Control RNA** au mélange maître (voir le tableau 4).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition pour l'amplification, il convient d'utiliser 20 µL du **Internal Control RNA** pendant l'extraction. Si possible, il est recommandé d'ajouter le **Internal Control DNA** dans la cartouche d'échantillon avant d'ajouter l'échantillon. Il est recommandé de pipeter 1 µL du **Internal Control DNA** par réaction dans le mélange de PCR du contrôle négatif et du contrôle positif.

## 9. Réalisation du test

### 9.1 Préparation du mélange maître

Il est nécessaire de calculer le nombre total de réactions (échantillons et réactions de contrôle) nécessaires à la PCR. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Il est recommandé d'ajouter 10 % de volume supplémentaire au mélange maître afin de compenser la perte au pipetage (voir les tableaux 3 et 4). Avant utilisation, décongeler le **Reaction Mix**, le **Enzyme Mix**, le **Positive Control**, le **No Template Control** et le **Internal Control RNA**, les passer à l'agitateur-mélangeur vortex (à l'exception du mélange enzymatique) et les centrifuger brièvement. Les réactifs doivent toujours être refroidis de manière appropriée pendant les étapes de travail (2 °C - 8 °C).

**Tableau 3 :** Exemple de calcul et de préparation du mélange maître pour 10 réactions (ICR pour extraction et contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µL	212,3 µL
2	<b>Enzyme Mix</b>	0,7 µL	7,7 µL
	<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

**Tableau 4 :** Exemple de calcul et de préparation du mélange maître pour 10 réactions (ICR uniquement comme contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µL	212,3 µL
2	<b>Enzyme Mix</b>	0,7 µL	7,7 µL
R	<b>Internal Control RNA</b>	1,0 µL	11 µL
	<b>Total</b>	<b>21,0 µL</b>	<b>231,0 µL</b>

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

## 9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µL du mélange maître dans chaque flacon de réaction (plaques).

**Contrôle négatif :** Pipeter 5 µL de **No Template Control** dans chaque mélange maître pré-pipeté.

**Remarque :** Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition, il convient d'ajouter 1 µL du **Internal Control RNA** à chaque mélange de contrôle négatif pour la PCR.

**Échantillons :** Ajouter 5 µL d'éluat à chaque mélange maître pré-pipeté.

**Contrôle positif :** Ajouter 5 µL de **Positive Control** à chaque mélange maître pipeté au préalable.

**Remarque :** Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition, il convient d'ajouter 1 µL du **Internal Control RNA** à chaque mélange de contrôle positif pour la PCR.

Fermer hermétiquement les plaques, les centrifuger brièvement à faible vitesse et les transférer vers un dispositif de PCR en temps réel. Démarrer la PCR selon la configuration de l'instrument de PCR (voir les tableaux 5 et 6).

## 9.3 Configuration de l'instrument de PCR

### 9.3.1 Profil universel de PCR en temps réel

Pour harmoniser les tests RIDA®GENE, le test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel a été vérifié par rapport au profil universel. Il est ainsi possible de combiner les tests ADN et ARN entre eux.

**Tableau 5** : Profil universel de PCR en temps réel pour LightCycler® 480 II

Transcription inverse	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
PCR Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ vitesse de montée de température	Durée de conservation

**Remarque** : L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

## 9.4 Réglage du canal de détection

**Tableau 6** : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Commentaire
Roche LightCycler® 480 II	Rhinovirus/ entérovirus/ paréchovirus	465/510	<b>Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.</b>
	ICR	533/580	
	Bocavirus	533/610	
	Adénovirus	618/660	

## 10. Contrôle qualité - signes d'instabilité ou de détérioration des réactifs

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse du dispositif de PCR en temps réel, conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle négatif et le contrôle positif doivent afficher les résultats corrects (voir le tableau 7).

Le **Positive Control** est présent à une concentration de  $10^3$  copies/ $\mu$ L. Chaque analyse par PCR utilise une quantité totale de  $5 \times 10^3$  copies.

**Tableau 7** : Pour être valide, une analyse de PCR doit remplir les conditions suivantes :

Échantillon	Résultat	Ct ICR	Ct gène cible
Contrôle positif	Positif	S/O *1	Voir le Certificate of Analysis
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	0

\*1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour obtenir un résultat positif de l'ICR pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif ne se situe pas dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé
- Procédure de test correcte

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir renouvelé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.



## 11. Interprétation des résultats

**Tableau 8** : Interprétation des résultats\*

Détection de				
Rhinovirus/ entérovirus/ paréchévirus	Bocavirus	Adénovirus	ICR	Résultat
+	-	-	+/-	Détection de rhinovirus/entérovirus/paréchévirus
-	+	-	+/-	Détection de bocavirus
-	-	+	+/-	Détection d'adénovirus
+	+	-	+/-	Détection de rhinovirus/entérovirus/paréchévirus et de bocavirus
+	-	+	+/-	Détection de rhinovirus/entérovirus/paréchévirus et d'adénovirus
-	+	+	+/-	Détection de bocavirus et d'adénovirus
+	+	+	+/-	Détection de rhinovirus/entérovirus/paréchévirus ; détection de bocavirus et d'adénovirus
-	-	-	+	Gènes cibles non détectables
-	-	-	-	Non valide

\* + = positif  
- = négatif

Un échantillon est positif si l'ARN de l'échantillon et le **Internal Control RNA** présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Un échantillon est également positif si l'ARN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le **Internal Control RNA**. La détection du **Internal Control RNA** (ICR) n'est pas indispensable dans ce cas, car une concentration élevée d'amplicons peut provoquer un signal faible ou absent du **Internal Control RNA**.

Un échantillon est négatif si l'ARN de l'échantillon ne présente pas de signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un signal visible pour le **Internal Control RNA**. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection du **Internal Control DNA**.

Un échantillon est non valide si l'ARN de l'échantillon et le Internal Control RNA ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. Des inhibiteurs de la PCR sont présents dans l'échantillon ou une erreur est survenue pendant le processus d'extraction.

## 12. Limites de la méthode

1. Le RIDA®GENE Pediatric Viral Panel test détecte l'ARN de rhinovirus/entérovirus/paréchovirus, l'ADN de bocavirus, et l'ADN d'adénovirus DNA dans les frottis nasopharyngés humains non traités. Ce test ne permet pas d'établir de rapport entre la valeur de Ct mesurée et la gravité des symptômes cliniques. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés au regard des symptômes cliniques dans leur ensemble.
2. Le diagnostic ne doit pas reposer uniquement sur le résultat du test de biologie moléculaire. Il doit toujours tenir compte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
3. Ce test est uniquement validé pour les frottis nasopharyngés.
4. Un échantillonnage, un transport, un stockage et un traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique du test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
5. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* basés sur la PCR, des concentrations extrêmement faibles des séquences cibles sous la limite de détection (LoD 95 %) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Des mutations ou polymorphismes au niveau des sites de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants ou de variants inconnus et entraîner des résultats faux négatifs avec le test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel.
8. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Un résultat positif indique la présence des gènes cibles (rhinovirus/entérovirus/paréchovirus (5'UTR), bocavirus (5'NTR) et adénovirus (hexon)).
9. Les substances dipropionate de bécloéthasone et dihydrocodéine peuvent avoir des propriétés interférentes, même à des faibles doses. À partir d'une concentration de 5 % [v/v], ratioAllerg® 50 µg (dipropionate de bécloéthasone) peut interférer sur la détection des adénovirus. Paracodin® N gouttes (dihydrocodéine) peut interférer sur la détection des entérovirus/rhinovirus/paréchovirus et sur la détection de l'IC à partir de la plus faible concentration testée de 3,0 % [v/v].
10. Ce test doit être réalisé conformément aux BPL (Bonnes pratiques de laboratoire). L'utilisateur doit suivre avec précision les instructions du fabricant lors de l'exécution du test.

## 13. Performances

### 13.1 Performances analytiques

#### 13.1.1 Limite de détection du dispositif

Pour déterminer la limite de détection du dispositif, 20 réplicats d'un échantillon de contrôle (50 copies/réaction (rhinovirus/entérovirus/paréchovirus, bocavirus, adénovirus)) ont été mesurés avec le LightCycler® 480 II. Tous les réplicats ont été positifs.

La limite de détection du dispositif est donc de 50 copies/réaction.

#### 13.1.3 Spécificités analytiques

##### Substances interférentes

La présence d'inhibiteurs de la PCR en temps réel et de substances interférentes peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides. De ce fait, les effets de diverses substances ont été étudiés, compte tenu de leur utilisation répandue en cas d'infections respiratoires ou de leur présence répandue dans les échantillons correspondants (frottis nasopharyngés).

Les substances susceptibles d'influencer de manière significative les résultats des tests ont été examinées dans un premier temps à des concentrations élevées (le triple de la dose quotidienne ou la simulation du pire cas) dans un test d'interférence. Si une interférence potentielle était trouvée lors de ce test de réactivité pour une substance examinée, une relation dose-effet était établie entre la concentration de la substance en question et l'interférence.

Aucune interférence n'a été identifiée pour les substances figurant dans le tableau 10.

**Tableau 10 :** Substances potentiellement interférentes

Substance potentiellement interférente	Concentration
Amoxicillin-ratiopharm® 1000 mg comprimés pelliculés (amoxicilline)	1 mg/mL
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg comprimés pelliculés (azithromycine)	84 mg/mL
Sang humain	2 % [v/v]
Mucines	60 µg/mL
Nasenspray-ratiopharm® spray nasal (xylometazoline)	10 % [v/v]
Chlorure de sodium	10 % [v/v]
Neo-angin® spray (chlorhydrate de benzydamine)	10 % [v/v]
Phosphate d'oseltamivir	25 mg/mL
Paracetamol-ratiopharm® 500 mg comprimés (paracétamol)	10 mg/mL

Des effets inhibiteurs ont été observés pour les substances ratioAllerg<sup>®</sup> 50 µg (dipropionate de béclo méthasone) (5 % [v/v]) et Paracodin<sup>®</sup> N gouttes (dihydrocodéine) (3,0 % [v/v]) (voir la section Limites de la méthode).

### Réactivité croisée

Ont également été étudiés divers organismes (bactéries, virus, champignons) que l'on trouve couramment dans la matrice des frottis nasopharyngés. Les micro-organismes étudiés dans le cadre de ce test ont été sélectionnés soit en raison de leur présence naturelle dans la matrice, soit en raison des symptômes qu'ils provoquent en tant que pathogènes respiratoires. Ont été utilisés aux fins de ces analyses des cultures bactériennes (entre 10<sup>6</sup> et 10<sup>9</sup> CFU\*/mL), fongiques ou virales, des surnageants de cultures bactériennes, de champignons ou virales, des isolats, ou des standards LGC ou NIBSC des organismes concernés.

Le test RIDA<sup>®</sup>GENE Pediatric Viral Panel est une RT-PCR multiplexe en temps réel est spécifique aux rhinovirus/entérovirus/paréchovirus, bocavirus et adénovirus. Aucune réactivité croisée avec les espèces suivantes n'a été décelée (voir le tableau 11) :

**Tableau 11 :** Organismes à réaction croisée potentielle

Organisme	Résultat du test*		
	Rhinovirus/ entérovirus/ paréchovirus	Bocavirus	Adénovirus
<i>Acinetobacter baumannii</i> souche 5377	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-
<i>Bordetella parapertussis</i> souche 12822	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	-	-
Virus d'Epstein-Barr souche B95-8	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-
Virus Herpes simplex 1 souche McIntyre	-	-	-
Virus Herpes simplex 2 souche MS	-	-	-
Coronavirus humain 229E	-	-	-

Coronavirus humain OC43	-	-	-
Coronavirus humain SARS-CoV-2 (isolat : Italie-INMI1)	-	-	-
MERS-CoV souche : Floride/USA-2 Arabie saoudite 2014	-	-	-
Cytomégalovirus humain	-	-	-
Métapneumovirus humain	-	-	-
Virus parainfluenza humain 1 souche C35	-	-	-
Virus parainfluenza humain 2 souche Greer	-	-	-
Virus parainfluenza, sérotype 3	-	-	-
Virus parainfluenza 4a souche M-25	-	-	-
Virus respiratoire syncytial humain souche Long	-	-	-
Virus respiratoire syncytial humain souche 9320	-	-	-
Grippe A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	-	-	-
Grippe A/Victoria/2570/2019 (H1N1)	-	-	-
Virus de la grippe B/Washington/02/2019	-	-	-
Grippe B/Phuket/3073/2013/ (lignée Yamagata)	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> souche MGH 78578	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> souche FH d'Eaton Agent	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> souche FAM18	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> souche NCTC 7465	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	-	-

- = négatif

### 13.1.4 Précision

La précision du test de PCR en temps réel RIDA®GENE Pediatric Viral Panel a été déterminée pour les niveaux de considération suivants.

Précision *intra*-essai : déterminée sur 5 échantillons de contrôle, à raison de 20 réplicats par échantillon, sur le LightCycler® 480 II dans des conditions identiques.

Précision *inter*-essais : déterminée sur 5 échantillons de contrôle testés en double au cours de 20 analyses réalisées sur 10 jours (2 analyses par jour) par deux opérateurs dans des conditions reproductibles.

Les tests de précision *intra*-essai et *inter*-essais ont été réalisés à l'aide de trois lots différents.

Les données relatives à la précision ont été obtenues en utilisant cinq échantillons de contrôle, ainsi que le PTC et le NTC du test.

Le coefficient de variation maximal obtenu pour chaque mesure à l'aide du test PCR en temps réel RIDA®GENE Pediatric Viral Panel sur LightCycler® 480 II était de 3,16 %.

**Tableau 12 :** Résultats relatifs à la précision du test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel test pour les rhinovirus/ entérovirus/ paréchovirus.

Valeur Ct/CV moyenne	<i>Intra</i> -essai			<i>Inter</i> -essais			<i>Inter</i> -lots	
	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lots des kits 1 à 3	
1	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
2	Ct	31,0	30,6	30,9	31,9	31,9	31,6	31,8
	CV (%)	1,11 %	1,49 %	0,75 %	2,09 %	2,43 %	2,06 %	2,23 %
3	Ct	32,0	31,9	31,8	33,3	32,8	33,0	33,0
	CV (%)	1,22 %	1,29 %	1,19 %	2,04 %	2,50 %	1,91 %	2,26 %
4	Ct	22,8	22,8	22,5	23,9	23,7	23,7	23,8
	CV (%)	1,12 %	0,96 %	0,91 %	2,87 %	3,16 %	2,45 %	2,84 %
5	Ct	26,1	25,9	26,2	27,2	26,9	27,0	27,1
	CV (%)	0,83 %	0,83 %	0,78 %	2,12 %	2,00 %	2,19 %	2,13 %

**Tableau 13 :** Résultats relatifs à la précision du test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel pour les bocavirus.

Valeur Ct/CV moyenne	Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lots des kits 1 à 3
1	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o
2	Ct	30,5	30,5	30,5	30,9	30,9	30,8
	CV (%)	0,91 %	0,67 %	0,70 %	1,25 %	1,03 %	1,16 %
3	Ct	31,4	31,5	31,6	32,2	32,1	32,2
	CV (%)	0,91 %	0,77 %	1,15 %	1,24 %	1,43 %	1,83 %
4	Ct	22,5	23,0	22,6	23,5	23,4	23,4
	CV (%)	1,03 %	0,76 %	0,53 %	1,26 %	1,66 %	1,56 %
5	Ct	25,7	25,7	26,2	26,5	26,5	26,6
	CV (%)	0,69 %	0,49 %	0,74 %	1,17 %	1,15 %	0,96 %

**Tableau 14 :** Résultats relatifs à la précision du test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel pour les adénovirus.

Valeur Ct/CV moyenne	Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots	
	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lots des kits 1 à 3	
1	Ct	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	
2	Ct	31,1	31,3	31,3	31,7	31,8	31,8	31,7
	CV (%)	1,15 %	1,08 %	1,38 %	1,50 %	1,51 %	1,09 %	1,38 %
3	Ct	32,7	32,5	32,4	33,0	32,9	33,0	33,0
	CV (%)	0,87 %	0,80 %	1,11 %	2,05 %	1,39 %	1,66 %	1,72 %
4	Ct	23,7	23,9	23,6	24,3	24,4	24,4	24,4
	CV (%)	1,05 %	0,77 %	0,65 %	1,98 %	1,46 %	1,69 %	1,72 %
5	Ct	27,1	26,8	27,4	27,3	27,4	27,5	27,4
	CV (%)	0,93 %	0,83 %	0,68 %	1,85 %	1,65 %	1,23 %	1,62 %



### 13.1.5 Réactivité analytique

La réactivité du test RT-PCR en temps réel RIDA® GENE Pediatric Viral Panel a été examinée sur un panel défini de souches/sous-types de virus (voir le tableau 15).

**Tableau 15 :** Test de la réactivité analytique

Souche	Concentration	Résultat*		
		Rhinovirus/ entérovirus/ paréchovirus	Bocavirus	Adénovirus
Adénovirus 1, humain souche Adénoïde 71 (sous-groupe C)	1 x 10 <sup>-5</sup> µg/mL	-	-	+
Adénovirus 40, humain, souche Dugan (sous- groupe F)	1,26 U/mL	-	-	+
Adénovirus 41, humain, souche Tak (sous-groupe F)	1,17 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adénovirus, type 2 (sous-groupe C)	8,51 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adénovirus, type 3 (sous-groupe B)	1 x 10 <sup>3,23</sup> U/mL	-	-	+
Adénovirus, type 4 (sous-groupe E)	1,41 U/mL	-	-	+
Adénovirus type 11 (sous- groupe B)	1 x 10 <sup>0,29</sup> U/mL	-	-	+
Adénovirus type 31 (sous- groupe A)	1 x 10 <sup>0,15</sup> U/mL	-	-	+
Adénovirus type 37 (sous- groupe D)	1 x 10 <sup>-1,98</sup> U/mL	-	-	+
Adénovirus type 5 souche stock S/O (sous-groupe C)	1:100	-	-	+
Adénovirus type 7A (sous- groupe B)	1 x 10 <sup>3,06</sup> U/mL	-	-	+
Bocavirus, HBoV1	1:10 <sup>6</sup>	-	+	-
Entérovirus A - coxsackievirus A2, souche Fleetwood	1,51 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Entérovirus A - entérovirus type 71, (souche 2003 isolat)	4,57 TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Entérovirus B - coxsackievirus B4	1 x 10 <sup>2,5</sup> U/mL	+	-	-
Entérovirus B - échovirus 11	5,89 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-

Entérovirus C - coxsackievirus A21, souche Kuykendall	1 x 10 <sup>3,29</sup> U/mL	+	-	-
Entérovirus C - coxsackievirus A24, souche DN-19	1:10 <sup>4</sup>	+	-	-
Entérovirus D - entérovirus type 68 souche 2007 isolat	1,26 x 10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Entérovirus D - entérovirus type 70, souche J670/71	1:10 <sup>5</sup>	+	-	-
Paréchovirus type 1, souche Harris	3,39 x 10 <sup>4</sup> U/mL	+	-	-
Paréchovirus type 3	4,07 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rhinovirus type 1A	4,17 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus A16	1,26 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus A80	1,17 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus B14	1,05 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rhinovirus B42	2,45 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus B70	1,70 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-

\*+ = positif (au moins 2 réplicats positifs sur 3)










- = négatif

#### 14. Historique des versions






Numéro de version	Section et désignation
2022-03-03	Version de la publication

## 15. Signification des symboles

### Symboles généraux

	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>
	Respecter le manuel d'utilisation
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de conservation
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

### Symboles spécifiques aux tests

	Mélange réactionnel
	Mélange d'enzymes
	Contrôle de l'extraction/inhibition
	Contrôle négatif
	Contrôle positif

## 16. Références

1. Brini I, Guerrero A, Hannachi N, Bouguila J, Orth-Höller D, Bouhlel A, u. a. Epidemiology and clinical profile of pathogens responsible for the hospitalization of children in Sousse area, Tunisia. *PloS One*. 2017;12(11):e0188325.
2. Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. Oktober 2018;24(10):1055-63.
3. Ma X, Conrad T, Alchikh M, Reiche J, Schweiger B, Rath B. Can we distinguish respiratory viral infections based on clinical features? A prospective pediatric cohort compared to systematic literature review. *Rev Med Virol*. September 2018;28(5):e1997.
4. Mummidi PS, Tripathy R, Dwibedi B, Mahapatra A, Baraha S. Viral aetiology of wheezing in children under five. *Indian J Med Res*. Februar 2017;145(2):189-93.
5. Sonawane AA, Shastri J, Bavdekar SB. Respiratory Pathogens in Infants Diagnosed with Acute Lower Respiratory Tract Infection in a Tertiary Care Hospital of Western India Using Multiplex Real Time PCR. *Indian J Pediatr*. Mai 2019;86(5):433-8.
6. PERCH study group (The Pneumonia Etiology Research for Child Health Study Group). Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study. *Lancet Lond Engl*. 31. August 2019;394(10200):757-79.
7. Robert-Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 22/2019. 29. Mai 2019;6.
8. Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. *Microbiol Spectr*. August 2016;4(4).
9. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, u. a. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 21. Oktober 2016;22(39):8684-97.
10. Christensen A, Kesti O, Elenius V, Eskola AL, Døllner H, Altunbulakli C, u. a. Human bocaviruses and paediatric infections. *Lancet Child Adolesc Health*. Juni 2019;3(6):418-26.
11. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol*. Januar 2012;22(1):46-64.
12. Greenberg SB. Update on rhinovirus and coronavirus infections. *Semin Respir Crit Care Med*. August 2011;32(4):433-46.
13. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol*. Januar 2015;235(2):217-28.
14. Messacar K, Abzug MJ, Dominguez SR. The Emergence of Enterovirus-D68. *Microbiol Spectr*. Juni 2016;4(3).

15. To KKW, Yip CCY, Yuen K-Y. Rhinovirus - From bench to bedside. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*. Juli 2017;116(7):496-504.
16. Hayes A, Nguyen D, Andersson M, Antón A, Bailly J-L, Beard S, u. a. A European multicentre evaluation of detection and typing methods for human enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *J Med Virol*. August 2020;92(8):1065-74.
17. Simonen-Tikka M-L, Klemola P, Suomenrinne S, Kajjalainen S, Söderström D, Savolainen-Kopra C, u. a. Virus infections among young children--the first year of the INDIS study. *J Med Virol*. September 2013;85(9):1678-84.
18. Cox DW, Le Souëf PN. Rhinovirus and the developing lung. *Paediatr Respir Rev*. September 2014;15(3):268-74.
19. Chen B-C, Chang J-T, Huang T-S, Chen J-J, Chen Y-S, Jan M-W, u. a. Parechovirus A Detection by a Comprehensive Approach in a Clinical Laboratory. *Viruses*. 12. Dezember 2018;10(12).
20. McNeale D, Wang CYT, Arden KE, Mackay IM. HPeV-3 predominated among Parechovirus A positive infants during an outbreak in 2013-2014 in Queensland, Australia. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2018;98:28-32.
21. Piralla A, Furione M, Rovida F, Marchi A, Stronati M, Gerna G, u. a. Human parechovirus infections in patients admitted to hospital in Northern Italy, 2008-2010. *J Med Virol*. April 2012;84(4):686-90.
22. Sillanpää S, Oikarinen S, Sipilä M, Seppälä E, Nurminen N, Rautiainen M, u. a. Human parechovirus as a minor cause of acute otitis media in children. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2015;62:106-9.
23. Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, u. a. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. September

# RIDA®GENE Pediatric Viral Panel

**REF** PG4725

## 1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica in vitro. Il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel, eseguito sullo strumento di PCR real-time LightCycler® 480 II, è una RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dell'RNA di rhinovirus/enterovirus/parechovirus, del DNA di bocavirus e del DNA di adenovirus in tamponi nasali/faringei umani non trattati di soggetti che presentano segni e sintomi di un'infezione respiratoria.

Il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel è concepito per supportare la diagnosi differenziale delle infezioni da rhinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus e adenovirus in pazienti con sintomi di infezione respiratoria in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono l'infezione da rhinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus o adenovirus e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi.

Il prodotto è destinato all'uso professionale.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Le infezioni virali delle vie respiratorie sono una delle cause primarie di ricoveri e visite cliniche nei bambini e negli anziani <sup>(1-6)</sup>. Oltre ai virus respiratori noti come l'influenza e il SARS-CoV-2, anche adenovirus, bocavirus, enterovirus, parechovirus e rhinovirus possono causare infezioni delle vie respiratorie.

Gli adenovirus umani (HAdV) appartengono alla famiglia Adenoviridae e al genere Mastadenovirus. Sono virus a DNA a doppio filamento, a forma di icosaedro, senza involucro, con un diametro compreso tra 65 e 110 nm. Sono suddivisi in sette specie (da A a G), che comprendono circa 67 sierotipi <sup>(7,8)</sup>.

I bocavirus umani (HBoV) sono parvovirus icosaedrici, piccoli e senza involucro <sup>(9-11)</sup>. Hanno un diametro compreso tra circa 18 nm e 26 nm e DNA a filamento singolo, con una dimensione del genoma da 4 kb a 6 kb (più le sequenze terminali di 32-52 nucleotidi). Il ruolo degli HBoV come passeggeri innocui è ancora controverso, perché sono spesso isolati in combinazione con altri agenti patogeni. Gli HBoV comprendono quattro sottotipi: HBoV1, HBoV2, HBoV3 e HBoV4 <sup>(9,10)</sup>.

Enterovirus e rinovirus sono virus a RNA a filamento singolo, icosaedrici, senza involucro, con una dimensione del genoma di circa 7,2 kb <sup>(12-15)</sup>. Prima dell'introduzione degli strumenti molecolari per classificare i patogeni, rinovirus ed enterovirus erano considerati due patogeni molto diversi <sup>(15)</sup>. Oggi sappiamo che sono geneticamente correlati tra loro. Appartengono entrambi al genere Enterovirus all'interno della famiglia Picornaviridae <sup>(13-17)</sup>. Gli enterovirus umani (HEV) comprendono quattro specie, HEV-A, HEV-B, HEV-C e HEV-D, con più di 200 sierotipi diversi. I rinovirus sono suddivisi in tre specie, rinovirus A, rinovirus B e rinovirus C, che comprendono circa 150 tipi diversi <sup>(12-18)</sup>. Come gli enterovirus e i rinovirus, i parechovirus umani (HPeV) appartengono alla famiglia Picornaviridae, ma sono classificati nel genere Parechovirus <sup>(16,17,19-22)</sup>. Gli HPeV sono virus a RNA a filamento singolo e senza involucro. Gli HPeV comprendono 19 genotipi (da HPeV1 a HPeV19), tra i quali HPeV1 e HPeV3 sono i più comuni <sup>(19,20)</sup>.

Le infezioni da HAdV che colpiscono le vie respiratorie sono segnalate con sintomi comuni simili a quelli del raffreddore, inclusi febbre, gola infiammata, vomito e diarrea; sono anche segnalate infezioni gravi con congiuntivite e infiammazione polmonare <sup>(3,7,8)</sup>. Le infezioni da HBoV inducono comunemente respiro sibilante e tosse. Entrambi i virus sono distribuiti in tutto il mondo e si presentano in ogni stagione, ma l'HBoV raggiunge il picco nei mesi invernali e primaverili <sup>(8,9)</sup>.

I sintomi delle infezioni da HEV delle vie respiratorie includono tosse, mancanza di respiro, respiro sibilante e febbre <sup>(14)</sup>. Le infezioni da HEV sono più comuni in estate e autunno nei climi temperati e si verificano in ogni stagione nelle regioni tropicali <sup>(13)</sup>. I rinovirus sono distribuiti in tutto il mondo, con una maggiore prevalenza in primavera e autunno <sup>(12,15)</sup>. Si presentano comunemente nei pazienti con polmonite, bronchiolite o un'infezione dell'orecchio medio e possono presentarsi con o senza copatogeni. I rinovirus provocano sintomi come rinorrea, gola infiammata, tosse, cefalea, congestione nasale e malessere <sup>(15)</sup>. I sintomi comuni di un'infezione da HPeV sono quelli del raffreddore, come naso chiuso, febbre e tosse <sup>(20,21,23)</sup>.

Solitamente, le infezioni respiratorie virali con questi virus sono autolimitanti o asintomatiche, ma i bambini, gli anziani e i pazienti con immunodeficienza possono sviluppare forme gravi di malattia <sup>(7-9,14-16,19,22)</sup>.

### 3. Principio del test

Il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel è una RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dell'RNA di rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus, del DNA di bocavirus e del DNA di adenovirus in tamponi nasali/faringei umani.

Dopo l'isolamento del DNA, vengono amplificati (se presenti) i frammenti genici specifici di rhinovirus/enterovirus/parechovirus (5'UTR), bocavirus (5'NTR) e adenovirus (esone). Le sequenze target amplificate vengono rivelate con sonde a idrolisi etichettate con un quencher a un'estremità e un colorante reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. In presenza di una sequenza target, le sonde ibridano con l'amplicone. Durante l'estensione, la **Taq-Polymerase** separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale fluorescente aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel contiene un **Internal Control RNA** (ICR) che serve a verificare la preparazione del campione e/o la potenziale inibizione della PCR.

### 4. Contenuto della confezione

I reagenti nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni.

**Tabella 1:** Contenuto della confezione

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del tappo
1	<b>Reaction Mix</b>	2 ×	1050 µL	giallo, pronto per l'uso
2	<b>Enzyme Mix</b>	1 ×	80 µL	rosso, pronto per l'uso
R	<b>Internal Control RNA</b>	2 ×	1700 µL	marrone, pronto per l'uso
N	<b>No Template Control</b>	1 ×	450 µL	bianco, pronto per l'uso
P	<b>Positive Control</b>	1 ×	200 µL	blu, pronto per l'uso



## 5. Istruzioni di conservazione

- Seguire le linee guida per la manipolazione contenute nella Tabella 2 e riporre il kit immediatamente dopo l'uso attenendosi alle informazioni specificate.
- Tutti i reagenti devono essere conservati lontano dalla luce a una temperatura di -20 °C, e prima dell'apertura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati con cura prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2 °C-8 °C).
- Il congelamento/scongelo ripetuto fino a 20 volte non influisce sulla proprietà del test (se necessario, creare aliquote dopo il primo scongelamento e ricongelare i reagenti immediatamente).
- Raffreddare adeguatamente tutti i reagenti durante la preparazione della PCR (2 °C-8 °C).

**Tabella 2:** Condizioni di conservazione e informazioni

	Temperatura di conservazione	Tempo massimo di conservazione
prima dell'apertura	-20 °C	Utilizzabile fino alla data di scadenza stampata
dopo l'apertura	-20 °C	20 cicli di congelamento e scongelamento

## 6. Reagenti necessari ma non forniti

### 6.1 Reagenti

Nessuno.

### 6.2 Attrezzatura di laboratorio

Per eseguire il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel è necessaria la seguente attrezzatura:

<b>Attrezzatura</b>
Piattaforma di estrazione: Strumento MagNA Pure 96 (Roche)
Strumento di PCR real-time: LightCycler® 480 II (Roche)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm)
Materiali di consumo per PCR real-time (piastre [profilo basso, pozzetti bianchi, telaio trasparente], cuvette di reazione, pellicole)
Centrifuga con rotore per piastre
Agitatore a vortice
Pipette (0,5-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)
Puntali per pipette con filtri
Guanti monouso senza talco

Per domande sull'uso di attrezzature per la lavorazione automatizzata, contattare R-Biopharm AG su [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Avvertenze e misure precauzionali

Solo per la diagnostica *in vitro*.

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

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

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

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

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

Per prevenire la contaminazione crociata e risultati falsi positivi è necessario utilizzare locali separati e indumenti e strumenti dedicati per l'estrazione, la preparazione e l'esecuzione della PCR.

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

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

Non scambiare o mescolare i componenti (Reaction Mix, Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, No Template Control) di un lotto di un kit con i componenti di un altro lotto.

Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza. Gli operatori sono tenuti al corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Ulteriori dettagli sulla scheda di dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) sono disponibili cercando il codice articolo alla pagina <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

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

## 8. Raccolta e conservazione dei campioni

### 8.1 Preparazione del DNA/RNA da tamponi nasali e faringei

Per la preparazione del DNA/RNA dai tamponi nasali e faringei si raccomanda il kit MagNA Pure 96 DNA/Viral NA SV sullo strumento MagNA Pure 96 (Roche). A questo scopo usare il protocollo Pathogen Universal 200 ed eluire in 50 µL. Attenersi alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel contiene un **Internal Control RNA** che indica l'inibizione potenziale della PCR, verifica l'integrità dei reagenti e conferma l'avvenuta estrazione dell'acido nucleico. L'**Internal Control RNA** può essere utilizzato solo come controllo dell'inibizione oppure come controllo del processo (estrazione e controllo inibizione).

Quando l'**Internal Control RNA** viene utilizzato solo come controllo di inibizione per l'amplificazione, è necessario aggiungere 1 µL di **Internal Control RNA** alla master mix (vedere Tabella 4).

Quando l'**Internal Control RNA** viene utilizzato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione per l'amplificazione, durante l'estrazione devono essere utilizzati 20 µL di **Internal Control RNA**. Si consiglia, se possibile, di aggiungere l'Internal Control RNA alla cartuccia del campione prima di aggiungere il campione. Si raccomanda di pipettare 1 µL di **Internal Control RNA** per reazione nella PCR mix sia per il controllo negativo, sia per il controllo positivo.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Preparazione della master mix

Per la PCR è necessario calcolare il numero totale di reazioni (campioni e reazioni di controllo). Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si consiglia di aggiungere un ulteriore 10% di volume alla master mix per compensare eventuali perdite durante il pipettaggio (vedere Tabella 3 e Tabella 4).

Prima dell'uso,

scongela **Reaction Mix**, **Enzyme Mix**, **Positive Control**, **No Template Control** e **Internal Control RNA**, miscelare mediante agitatore a vortice (tranne l'Enzyme Mix) e centrifugare brevemente. I reagenti devono essere sempre adeguatamente raffreddati durante le fasi di lavoro (2 °C-8 °C).

**Tabella 3:** Esempio di calcolo e preparazione della Master Mix per 10 reazioni (ICR come controllo di estrazione e di inibizione)

Codice del kit	Componenti della master mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10%)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µL	212,3 µL
2	<b>Enzyme Mix</b>	0,7 µL	7,7 µL
	<b>Totale</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

Mescolare la master mix e quindi centrifugare per breve tempo.

**Tabella 4:** Esempio di calcolo e preparazione della Master Mix per 10 reazioni (ICR solo come controllo di inibizione)

Codice del kit	Componenti della master mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10%)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µL	212,3 µL
2	<b>Enzyme Mix</b>	0,7 µL	7,7 µL
R	<b>Internal Control RNA</b>	1,0 µL	11 µL
	<b>Totale</b>	<b>21,0 µL</b>	<b>231,0 µL</b>

Mescolare la master mix e quindi centrifugare per breve tempo.

## 9.2 Preparazione della PCR mix

Pipettare 20 µL della master mix in ogni cuvetta di reazione (piastre).

**Controllo negativo:** Aggiungere 5 µL di **No Template Control** a ciascuna master mix pipettata in precedenza.

**Nota:** quando l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, si raccomanda di aggiungere 1 µL di **Internal Control RNA** alla PCR mix del controllo negativo.

**Campioni:** Aggiungere 5 µL di eluato a ciascuna master mix pipettata in precedenza.

**Controllo positivo:** Aggiungere 5 µL di **Positive Control** a ciascuna master mix pipettata in precedenza.

**Nota:** quando l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, si raccomanda di aggiungere 1 µL di **Internal Control RNA** alla PCR mix del controllo positivo.

Chiudere le piastre, centrifugare brevemente a bassa velocità e trasferire allo strumento di PCR real-time. Avviare la PCR in base alle impostazioni dello strumento (vedere Tabella 5 e Tabella 6).

## 9.3 Impostazioni dello strumento per PCR

### 9.3.1 Profilo universale della PCR real-time

Per armonizzare i test RIDA®GENE, il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel è stato verificato nel profilo universale. Questo rende possibile combinare tra loro i test del DNA e dell'RNA.

**Tabella 5:** Profilo universale PCR real-time per LightCycler® 480 II

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

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

## 9.4 Impostazione del canale di rivelazione

**Tabella 6:** Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Commento
Roche LightCycler® 480 II	Rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
	Bocavirus	533/610	
	Adenovirus	618/660	

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

I campioni vengono valutati utilizzando il software di analisi dello strumento di PCR real-time in base alle istruzioni del produttore. Il controllo negativo e il controllo positivo devono mostrare i risultati corretti (vedere Tabella 7).

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

**Tabella 7:** Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

Campione	Risultato	Ct ICR	Ct gene target
Controllo positivo	Positivo	N/A *1	Vedere il Certificato di Analisi (Certificate of Analysis)
Controllo negativo	Negativo	Ct >20	0

\*1 Un valore Ct per l'ICR non è essenziale per ottenere un risultato positivo per il controllo positivo.

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

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

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

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

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

## 11. Interpretazione del risultato

**Tabella 8:** Interpretazione del risultato\*

Rivelazione di				
Rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus	Bocavirus	Adenovirus	ICR	Risultato
+	-	-	+/-	Rhinovirus/enterovirus/ parechovirus rivelabili
-	+	-	+/-	Bocavirus rivelabile
-	-	+	+/-	Adenovirus rivelabile
+	+	-	+/-	Rhinovirus/enterovirus/ parechovirus e bocavirus rivelabili
+	-	+	+/-	Rhinovirus/enterovirus/ parechovirus e adenovirus rivelabili
-	+	+	+/-	Bocavirus e adenovirus rivelabili
+	+	+	+/-	Rhinovirus/enterovirus/ parechovirus, bocavirus e adenovirus rivelabili
-	-	-	+	Geni target non rivelabili
-	-	-	-	Non valido

\* + = positivo  
- = negativo

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

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

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

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



## 12. Limiti del metodo

1. Il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel rivela l'RNA di rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus, il DNA di bocavirus e il DNA di adenovirus in tamponi nasali/faringei umani non trattati. Pertanto, non è possibile dedurre una correlazione tra il livello di un determinato valore Ct e la presenza di sintomi clinici gravi. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati in combinazione con la sintomatologia clinica nel suo complesso.
2. La diagnosi non dovrebbe basarsi solo sul risultato del test biologico molecolare, ma dovrebbe sempre tenere conto dell'anamnesi e dei sintomi del paziente.
3. Questo test è convalidato solo per tamponi nasali/faringei.
4. Procedure inadeguate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento o un carico di patogeni al di sotto della sensibilità analitica del test possono produrre falsi negativi.
5. La presenza di inibitori della PCR può portare a risultati falsi negativi o non validi.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, possono essere rivelate concentrazioni delle sequenze target sotto il limite di rivelazione (LoD 95%), ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.
7. Eventuali mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione di varianti nuove o sconosciute e possono produrre risultati falsi negativi utilizzando RIDA®GENE Pediatric Viral Panel.
8. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un risultato positivo indica la presenza dei geni target (rhinovirus/enterovirus/parechovirus (5'UTR), bocavirus (5'NTR) e adenovirus (esone)).
9. Le sostanze beclometasone dipropionato e diidrocodeina possono avere proprietà interferenti, anche in piccole quantità. A partire da una concentrazione del 5% [v/v], ratioAllerg® 50 µg (beclometasone dipropionato) ha un effetto interferente sulla rivelazione dell'adenovirus. Le gocce di Paracodin® N (diidrocodeina) hanno un effetto interferente sulla rivelazione di enterovirus/rhinovirus/parechovirus e sulla rivelazione dell'IC a partire dalla più bassa concentrazione testata del 3,0% [v/v].
10. Questo test deve essere eseguito in conformità con il regolamento sulle buone pratiche di laboratorio (BPL). Gli operatori devono seguire esattamente le istruzioni del fabbricante durante l'esecuzione del test.

## 13. Prestazioni e caratteristiche

### 13.1 Prestazioni e caratteristiche analitiche

#### 13.1.1 Limite di rivelazione dello strumento

Per determinare il limite di rivelazione dello strumento sono stati misurati 20 replicati di un campione di controllo (50 copie/reazione (rhinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus, adenovirus)) su LightCycler® 480 II. Tutti i replicati erano positivi.

Il limite di rivelazione dello strumento è quindi di 50 copie/reazione.

#### 13.1.3 Specificità analitica

##### Sostanze interferenti

La presenza di inibitori della PCR e di sostanze interferenti può portare a risultati falsi negativi o non validi. Quindi, sono stati studiati gli effetti di diverse sostanze che potrebbero essere presenti in quanto ampiamente utilizzate nelle infezioni respiratorie o a causa della loro presenza diffusa nei campioni corrispondenti (tamponi nasali/faringei).

Le sostanze che potrebbero influenzare in modo significativo i risultati del test sono state esaminate inizialmente ad alte concentrazioni (il triplo della dose giornaliera o la simulazione del caso peggiore) in un'analisi di interferenza. Se dall'analisi di interferenza risultava una potenziale interferenza con una delle sostanze esaminate, è stata stabilita una relazione dose-effetto tra la concentrazione della sostanza in questione e l'interferenza.

Non sono state individuate interferenze per le sostanze elencate nella Tabella 10.

**Tabella 10:** Sostanze potenzialmente interferenti

Sostanza potenzialmente interferente	Concentrazione
Amoxicillin-ratiopharm® compresse rivestite con film da 1000 mg (amoxicillina)	1 mg/mL
Azithromycin-ratiopharm® compresse rivestite con film da 500 mg (azitromicina)	84 mg/mL
Sangue umano	2% [v/v]
Mucine	60 µg/mL
Nasenspray-ratiopharm® spray nasale (xilometazolina)	10% [v/v]
Cloruro di sodio	10% [v/v]
Neo-angin® spray (benzidamina cloridrato)	10% [v/v]
Oseltamivir fosfato	25 mg/mL
Paracetamol-ratiopharm® compresse da 500 mg (paracetamolo)	10 mg/mL

Sono stati osservati effetti inibitori per le sostanze ratioAllerg® 50 µg (beclometasone dipropionato) (5% [v/v]) e Paracodin® N gocce (diidrocodeina) (3,0% [v/v]) (vedere Limiti del metodo).

### Reattività crociata

Sono stati studiati vari organismi (batteri, virus, funghi) che si trovano comunemente nella matrice dei tamponi nasali/faringei. I microrganismi da studiare per questo test sono stati scelti perché si trovano naturalmente nella matrice o causano sintomi corrispondenti ai patogeni respiratori. Per le analisi sono state utilizzate colture batteriche (tra 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> CFU\*/mL); colture fungine o virali; surnatanti di colture batteriche, fungine o virali; e standard LGC e NIBSC dei particolari organismi.

Il test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Pediatric Viral Panel è specifico per rhinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus e adenovirus. Non sono state rivelate reattività crociate con le seguenti specie (vedere Tabella 11):

**Tabella 11:** Organismi potenzialmente cross-reattivi

Organismo	Risultato del test*		
	Rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus	Bocavirus	Adenovirus
<i>Acinetobacter baumannii</i> , ceppo 5377	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-
<i>Bordetella parapertussis</i> , ceppo 12822	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	-	-
Virus di Epstein-Barr, ceppo B95-8	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-
Virus dell'herpes simplex 1, ceppo McIntyre	-	-	-
Virus dell'herpes simplex 2, ceppo MS	-	-	-
Coronavirus 229E umano	-	-	-
Coronavirus OC43 umano	-	-	-
Coronavirus umano SARS-CoV-2 (isolato: Italia-INMI1)	-	-	-

MERS-CoV, ceppo: Florida/USA-2 Arabia Saudita 2014	-	-	-
Cytomegalovirus umano	-	-	-
Metapneumovirus umano	-	-	-
Virus parainfluenzale umano 1, ceppo C35	-	-	-
Virus parainfluenzale umano 2, ceppo Greer	-	-	-
Virus parainfluenzale umano sierotipo 3	-	-	-
Virus parainfluenzale 4a, ceppo M-25	-	-	-
Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo Long	-	-	-
Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo 9320	-	-	-
Influenza A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	-	-	-
Influenza A/Victoria/2570/2019 (H1N1)	-	-	-
Influenza B/Washington/02/2019	-	-	-
Influenza B/Phuket/3073/2013 (Yamagata lineage)	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ceppo MGH 78578	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , ceppo FH di agente Eaton	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> , ceppo FAM18	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ceppo NCTC 7465	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	-	-

- = negativo

### 13.1.4 Precisione

La precisione del test di RT-PCR real-time RIDA®GENE Pediatric Viral Panel è stata determinata per i seguenti livelli di valutazione.

Precisione *intra*-test: determinazione di 5 campioni di controllo utilizzando 20 replicati ciascuno su LightCycler® 480 II in condizioni identiche.

Precisione *inter*-test: determinazione di 5 campioni di controllo in 20 esecuzioni in duplicato in 10 giorni di lavoro (2 esecuzioni al giorno) eseguite da due tecnici diversi in condizioni riproducibili.

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

I dati di precisione sono stati ottenuti utilizzando cinque campioni di controllo, nonché il PTC e l'NTC appartenenti al test.

Il massimo coefficiente di variazione ottenuto dalle misurazioni con il test di RT-PCR real-time RIDA®GENE Pediatric Viral Panel su LightCycler® 480 II è stato del 3,16%.

**Tabella 12:** Risultati della precisione del test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel per rhinovirus/enterovirus/parechovirus.

Valore medio Ct / CV	<i>Intra</i> -test			<i>Inter</i> -test			<i>Inter</i> -lotto
	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
2	Ct	31,0	30,6	30,9	31,9	31,9	31,6
	CV (%)	1,11%	1,49%	0,75%	2,09%	2,43%	2,06%
3	Ct	32,0	31,9	31,8	33,3	32,8	33,0
	CV (%)	1,22%	1,29%	1,19%	2,04%	2,50%	1,91%
4	Ct	22,8	22,8	22,5	23,9	23,7	23,7
	CV (%)	1,12%	0,96%	0,91%	2,87%	3,16%	2,45%
5	Ct	26,1	25,9	26,2	27,2	26,9	27,0
	CV (%)	0,83%	0,83%	0,78%	2,12%	2,00%	2,19%

**Tabella 13:** Risultati della precisione del test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel per il bocavirus.

Valore medio Ct / CV	<i>Intra-test</i>			<i>Inter-test</i>			<i>Inter-lotto</i>	
	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3	
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
2	Ct	30,5	30,5	30,5	30,9	30,9	30,8	30,9
	CV (%)	0,91%	0,67%	0,70%	1,25%	1,03%	1,16%	1,16%
3	Ct	31,4	31,5	31,6	32,2	32,1	32,2	32,2
	CV (%)	0,91%	0,77%	1,15%	1,24%	1,43%	1,83%	1,52%
4	Ct	22,5	23,0	22,6	23,5	23,4	23,4	23,4
	CV (%)	1,03%	0,76%	0,53%	1,26%	1,66%	1,56%	1,50%
5	Ct	25,7	25,7	26,2	26,5	26,5	26,6	26,5
	CV (%)	0,69%	0,49%	0,74%	1,17%	1,15%	0,96%	1,10%

**Tabella 14:** Risultati della precisione del test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel per l'adenovirus.

Valore medio Ct / CV	<i>Intra-test</i>			<i>Inter-test</i>			<i>Inter-lotto</i>
	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
2	Ct	31,1	31,3	31,3	31,7	31,8	31,8
	CV (%)	1,15%	1,08%	1,38%	1,50%	1,51%	1,09%
3	Ct	32,7	32,5	32,4	33,0	32,9	33,0
	CV (%)	0,87%	0,80%	1,11%	2,05%	1,39%	1,66%
4	Ct	23,7	23,9	23,6	24,3	24,4	24,4
	CV (%)	1,05%	0,77%	0,65%	1,98%	1,46%	1,69%
5	Ct	27,1	26,8	27,4	27,3	27,4	27,5
	CV (%)	0,93%	0,83%	0,68%	1,85%	1,65%	1,23%

### 13.1.5 Reattività analitica

La reattività del test di RT-PCR real-time RIDA® GENE Pediatric Viral Panel è stata esaminata su un gruppo definito di ceppi/sottotipi virali (vedere Tabella 15).

**Tabella 15:** Test di reattività analitica

Ceppo	Concentrazione	Risultato*		
		Rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus	Bocavirus	Adenovirus
Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71 (sottogruppo C)	1 x 10 <sup>-5</sup> µg/mL	-	-	+
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan (sottogruppo F)	1,26 U/mL	-	-	+
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak (sottogruppo F)	1,17 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adenovirus tipo 2 (sottogruppo C)	8,51 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adenovirus tipo 3 (sottogruppo B)	1 x 10 <sup>3,23</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 4 (sottogruppo E)	1,41 U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 11 (sottogruppo B)	1 x 10 <sup>0,29</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 31 (sottogruppo A)	1 x 10 <sup>0,15</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 37 (sottogruppo D)	1 x 10 <sup>-1,98</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 5 stock ceppo N/A (sottogruppo C)	1:100	-	-	+
Adenovirus tipo 7A (sottogruppo B)	1 x 10 <sup>3,06</sup> U/mL	-	-	+
Bocavirus, HBoV1	1:10 <sup>6</sup>	-	+	-
Enterovirus A - coxsackievirus A2, ceppo Fleetwood	1,51 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus A - enterovirus tipo 71, ceppo isolato nel 2003	4,57 TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Enterovirus B - coxsackievirus B4	1 x 10 <sup>2,5</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus B - echovirus 11	5,89 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-



Enterovirus C - coxsackievirus A21, ceppo Kuykendall	1 x 10 <sup>3,29</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus C - coxsackievirus A24, ceppo DN-19	1:10 <sup>4</sup>	+	-	-
Enterovirus D - enterovirus tipo 68, ceppo isolato nel 2007	1,26 x 10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Enterovirus D - enterovirus tipo 70, ceppo J670/71	1:10 <sup>5</sup>	+	-	-
Parechovirus tipo 1, ceppo Harris	3,39 x 10 <sup>4</sup> U/mL	+	-	-
Parechovirus tipo 3	4,07 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rhinovirus tipo 1A	4,17 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus A16	1,26 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus A80	1,17 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus B14	1,05 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rhinovirus B42	2,45 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus B70	1,70 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-

\*+ = positivo (almeno 2 dei 3 replicati positivi)










- = negativo

#### 14. Cronologia delle versioni






Numero della versione	Sezione e denominazione
2022-03-03	Versione di rilascio

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Uso per la diagnostica <i>in vitro</i>
	Attenersi al manuale operativo
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Fabbricante

### Simboli specifici del test

	Reaction Mix
	Enzyme Mix
	Controllo dell'estrazione/inibizione
	Controllo negativo
	Controllo positivo

## 16. Bibliografia

1. Brini I, Guerrero A, Hannachi N, Bouguila J, Orth-Höller D, Bouhlel A, u. a. Epidemiology and clinical profile of pathogens responsible for the hospitalization of children in Sousse area, Tunisia. *PloS One*. 2017;12(11):e0188325.
2. Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. Oktober 2018;24(10):1055-63.
3. Ma X, Conrad T, Alchikh M, Reiche J, Schweiger B, Rath B. Can we distinguish respiratory viral infections based on clinical features? A prospective pediatric cohort compared to systematic literature review. *Rev Med Virol*. September 2018;28(5):e1997.
4. Mummidi PS, Tripathy R, Dwibedi B, Mahapatra A, Baraha S. Viral aetiology of wheezing in children under five. *Indian J Med Res*. Februar 2017;145(2):189-93.
5. Sonawane AA, Shastri J, Bavdekar SB. Respiratory Pathogens in Infants Diagnosed with Acute Lower Respiratory Tract Infection in a Tertiary Care Hospital of Western India Using Multiplex Real Time PCR. *Indian J Pediatr*. Mai 2019;86(5):433-8.
6. PERCH study group (The Pneumonia Etiology Research for Child Health Study Group). Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study. *Lancet Lond Engl*. 31. August 2019;394(10200):757-79.
7. Robert-Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 22/2019. 29. Mai 2019;6.
8. Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. *Microbiol Spectr*. August 2016;4(4).
9. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, u. a. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 21. Oktober 2016;22(39):8684-97.
10. Christensen A, Kesti O, Elenius V, Eskola AL, Døllner H, Altunbulakli C, u. a. Human bocaviruses and paediatric infections. *Lancet Child Adolesc Health*. Juni 2019;3(6):418-26.
11. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol*. Januar 2012;22(1):46-64.
12. Greenberg SB. Update on rhinovirus and coronavirus infections. *Semin Respir Crit Care Med*. August 2011;32(4):433-46.
13. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol*. Januar 2015;235(2):217-28.
14. Messacar K, Abzug MJ, Dominguez SR. The Emergence of Enterovirus-D68. *Microbiol Spectr*. Juni 2016;4(3).

15. To KKW, Yip CCY, Yuen K-Y. Rhinovirus - From bench to bedside. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*. Juli 2017;116(7):496-504.
16. Hayes A, Nguyen D, Andersson M, Antón A, Bailly J-L, Beard S, u. a. A European multicentre evaluation of detection and typing methods for human enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *J Med Virol*. August 2020;92(8):1065-74.
17. Simonen-Tikka M-L, Klemola P, Suomenrinne S, Kajjalainen S, Söderström D, Savolainen-Kopra C, u. a. Virus infections among young children--the first year of the INDIS study. *J Med Virol*. September 2013;85(9):1678-84.
18. Cox DW, Le Souëf PN. Rhinovirus and the developing lung. *Paediatr Respir Rev*. September 2014;15(3):268-74.
19. Chen B-C, Chang J-T, Huang T-S, Chen J-J, Chen Y-S, Jan M-W, u. a. Parechovirus A Detection by a Comprehensive Approach in a Clinical Laboratory. *Viruses*. 12. Dezember 2018;10(12).
20. McNeale D, Wang CYT, Arden KE, Mackay IM. HPeV-3 predominated among Parechovirus A positive infants during an outbreak in 2013-2014 in Queensland, Australia. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2018;98:28-32.
21. Piralla A, Furione M, Rovida F, Marchi A, Stronati M, Gerna G, u. a. Human parechovirus infections in patients admitted to hospital in Northern Italy, 2008-2010. *J Med Virol*. April 2012;84(4):686-90.
22. Sillanpää S, Oikarinen S, Sipilä M, Seppälä E, Nurminen N, Rautiainen M, u. a. Human parechovirus as a minor cause of acute otitis media in children. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2015;62:106-9.
23. Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, u. a. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. September



# RIDA®GENE Pediatric Viral Panel

**REF** PG4725

## 1. Aplicação

Para utilização em diagnóstico *in vitro*. O teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel, realizado no instrumento LightCycler® 480 II real-time PCR é um RT-PCR multiplex em tempo real para a detecção qualitativa direta e diferenciação de RNA rinovirus/ enterovirus/ parechovirus, DNA bocavirus e DNA adenovirus em esfregaços nasais/garganta humanas não tratados de pessoas com sinais e sintomas de infecção respiratória.

O teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel se destina a apoiar o diagnóstico diferencial de infecções por rinovirus/enterovirus/parechovirus em pacientes com sintomas de infecção respiratória com outros achados clínicos e laboratoriais. Resultados negativos não excluem a infecção por rinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus ou adenovirus e não devem ser utilizados como única base para o diagnóstico.

O produto é destinado à utilização profissional.

## 2. Sumário e explicação do teste

As infecções respiratórias virais são uma das principais causas de hospitalizações e visitas clínicas de crianças e idosos.<sup>(1-6)</sup> Além dos vírus respiratórios conhecidos como influenza e SARS-CoV-2, adenovirus, bocavirus, enterovirus, parechovirus e rinovirus podem causar infecções do trato respiratório.

O grupo de vírus Adenovirus Humano (HAdVs) pertence à família Adenoviridae e ao gênero Mastadenovirus. São vírus de DNA em forma de icosaedro, não envelopados, de dupla cadeia com diâmetro de 65 a 110 nm. Eles estão divididos em sete espécies, (A a G), que compreendem cerca de 67 serotipos.<sup>(7,8)</sup>

Os vírus do grupo bocavirus humanos (HBoV) são icosaédricos, pequenos parvovirus não envelopados.<sup>(9-11)</sup> Possuem cerca de 18 nm a 26 nm de diâmetro e DNA de cadeia única com um genoma de 4 kb a 6 kb (e sequências terminais de 32 a 52 nucleotídeos). A definição dos HBoV como passageiros inofensivos ainda é um debate controverso, pois eles são frequentemente isolados em combinação com outros patógenos. O grupo de HBoV abrange quatro subtipos: HBoV1, HBoV2, HBoV3 e HBoV4.<sup>(9,10)</sup>

Enterovirus e rinovirus são vírus RNA de cadeia única, icosaédricos e não envelopados que apresentam um genoma de cerca de 7,2 kb.<sup>(12-15)</sup> Antes da introdução de ferramentas moleculares para classificar patógenos, os rinovirus e enterovirus eram considerados dois patógenos muito diferentes.<sup>(15)</sup> Hoje, sabemos que estão geneticamente relacionados um ao outro. Ambos pertencem ao genus enterovirus da família Picornaviridae.<sup>(13-17)</sup> Os enterovirus humanos (HEV) compreendem quatro espécies, HEV-A, HEV-B, HEV-C e HEV-D, com mais de 200 serótipos diferentes. Os rinovirus são divididos em três espécies, rinovirus A, rinovirus B e rinovirus C, que compreendem cerca de 150 tipos diferentes.<sup>(12-18)</sup> Como os enterovirus e rinovirus, os parechovirus humanos (HPeV) pertencem à família Picornaviridae, mas são classificados sob o genus Parechovirus.<sup>(16,17,19-22)</sup> Os HPeV são vírus de RNA de cadeia única e não envelopados. Os HPeV compreendem 19 genótipos (HPeV1 a HPeV19), enquanto o HPeV1 e o HPeV3 são os mais comuns.<sup>(19,20)</sup>

Infecções por HAdV que afetam o trato respiratório são relatadas com sintomas comuns de resfriado, incluindo febre, dor de garganta, vômitos e diarreia, e infecções graves são relatadas com conjuntivite e inflamação pulmonar.<sup>(3,7,8)</sup> Infecções por HBoV provocam chiado e tosse como sintomas comuns. Ambos os vírus estão presentes em todo o mundo e ocorrem ao longo do ano, enquanto o HBoV atinge seu pico no inverno e na primavera.<sup>(8,9)</sup>

Os sintomas relatados de infecções do trato respiratório do HVE incluem tosse, falta de ar, chiado e febre.<sup>(14)</sup> As infecções por HVE são mais comuns no verão e no outono em climas temperados e ocorrem durante todo o ano em regiões tropicais.<sup>(13)</sup> Os rinovirus estão presentes em todo o mundo, com maior prevalência na primavera e no outono.<sup>(12,15)</sup> Eles ocorrem normalmente em pacientes com pneumonia, bronquiolite ou infecção do ouvido médio e podem ocorrer com ou sem copatógenos. Os rinovirus causam sintomas como rinorreia, dor de garganta, tosse, dor de cabeça, congestão nasal e mal-estar.<sup>(15)</sup> Os sintomas comuns de uma infecção por HPeV são os mesmos sintomas de um resfriado, como nariz entupido e febre, bem como tosse.<sup>(20,21,23)</sup>

Normalmente as infecções respiratórias virais provocadas por esses vírus são limitadas ou assintomáticas, mas especialmente crianças, idosos e pacientes com imunodeficiência podem ser afetados por doenças graves.<sup>(7-9,14-16,19,22)</sup>

### 3. Princípio do teste

O teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel é um teste RT-PCR multiplex em tempo real para a detecção quantitativa e diferenciação direta de RNA de rinovirus/enterovirus/parechovirus, DNA de bocavirus e DNA de adenovirus esfregaços nasais/garganta humana.

Após o isolamento do DNA, (se presente) os fragmentos de genes específicos de rinovirus/enterovirus/parechovirus (5'UTR), bocavirus (5'NTR) e adenovirus (hexon) são amplificados. As sequências-alvo amplificadas são detectadas usando sondas de hidrólise que são etiquetadas com um supressor em uma extremidade e um corante de repórter fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridizam com o amplicon na presença de uma sequência alvo. Durante a extensão, a Taq-Polymerase separa o indicador do silenciador. O indicador emite um sinal fluorescente detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de amplicons formados. O teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel contém Internal Control RNA para conseguir controlar o preparo da amostra e/ou qualquer potencial inibição de PCR.

### 4. Reagentes fornecidos

Os reagentes no kit são suficientes para 100 determinações.

Tabela 1: Reagentes fornecidos

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	amarelo, pronto para utilização
2	Enzyme Mix	1 ×	80 µL	vermelho, pronto para utilização
R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µL	marrom, pronto para utilização
N	No Template Control	1 ×	450 µL	branco, pronto para utilização
P	Positive Control	1 ×	200 µL	azul, pronto para utilização



## 5. Instruções de armazenamento

- Siga as orientações de manuseio da Tabela 2 e armazene o kit diretamente após a utilização, conforme as informações especificadas.
- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz a -20 °C e, caso não abertos, podem ser utilizados até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término da data de validade.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 °C - 8 °C).
- O congelamento e descongelamento repetido até 20 vezes não afeta a propriedade do teste (se necessário, divida em porções após o primeiro descongelamento e congele os reagentes imediatamente).
- Descongele todos os reagentes adequadamente durante a preparação do PCR (2 °C - 8 °C).

**Tabela 2:** Condições e informações de armazenamento

	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento
fechado	-20 °C	Pode ser usado até a data de validade impressa
aberto	-20 °C	20 ciclos de congelamento e descongelamento

## 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

### 6.1 Reagentes

Nenhum.

### 6.2 Equipamentos de laboratório

Os seguintes equipamentos são necessários para realizar o teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel:

Equipamentos
Plataforma de extração: Instrumento MagNA Pure 96 (Roche)
Instrumento de PCR em tempo real: LightCycler® 480 II (Roche)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm)
Consumíveis para PCR em tempo real (placas (perfil baixo, poços brancos, armação transparente), tubos de reação, filmes adesivos)
Centrífuga com rotor para placas
Vortexer
Pipetas (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Pontas de pipeta com filtros
Luvras descartáveis sem pó

Para questionamentos sobre o uso de equipamentos para processamento automatizado, entre em contato com a R-Biopharm AG através do e-mail [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Avisos e precauções para os usuários

Apenas para uso em Diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório qualificado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas.

Ao realizar este teste, sempre siga estritamente o manual de operação.

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

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.

Salas separadas, vestuário especial e instrumentos para extração, preparação de PCR e de análise de PCR devem ser utilizados para evitar a contaminação cruzada e resultados falso-positivos.

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 troque ou combine os componentes (Reaction Mix, Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, No Template Control) de um lote de um kit com os componentes de outro lote.

Não use o kit após o prazo de validade. Os usuários são responsáveis por descartar adequadamente 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

### 8.1 Preparação de DNA/RNA de esfregaços nasais e da garganta

Para a preparação de DNA/RNA a partir de esfregaços nasais e de garganta, recomenda-se o kit MagNA Pure 96 DNA/Viral NA SV no equipamento MagNA Pure 96 (Roche). Para isso, use o protocolo Pathogen Universal 200 e elua em 50 µL. As instruções do fabricante devem ser observadas.

O teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel contém **Internal Control RNA** que indica a inibição potencial de PCR, verifica a integridade dos reagentes e confirma a extração bem sucedida do ácido nucléico. O **Internal Control RNA** pode ser utilizado apenas como um controle de inibição ou como um controle de processo (extração e controle de inibição).

Quando o **Internal Control RNA** é usado apenas como controle de inibição para amplificação, 1 µL do **Internal Control RNA** deve ser adicionado ao Master Mix (ver Tabela 4).

Quando o **Internal Control RNA** é usado como controle de extração para o preparo da amostra e como um controle de inibição para amplificação, então 20 µL do **Internal Control RNA** devem ser usados durante a extração. Se possível, é recomendado adicionar o Internal Control RNA ao cartucho da amostra antes de adicionar a amostra. É recomendado pipetar 1 µL do **Internal Control RNA** por reação à mistura de PCR do controle negativo e do controle positivo.

## 9. Realização do teste

### 9.1 Preparação do Master Mix

O número total de reações necessárias para a PCR (amostras e reações de controle) deve ser calculado. Em cada teste realizado, devem ser incluídos um controle positivo e um controle negativo.

Recomenda-se acrescentar um volume adicional de 10 % ao Master Mix para compensar qualquer perda de pipetagem (ver Tabela 3 e Tabela 4). Antes de utilizar, descongele o **Reaction Mix**, o **Enzyme Mix**, o **Positive Control**, o **No Template Control** e o **Internal Control RNA**, misture bem (exceto o Enzyme Mix) e centrifugue por um curto período de tempo. Os reagentes devem ser sempre resfriados adequadamente durante as etapas de trabalho (2 °C - 8 °C).

**Tabela 3:** Exemplo de cálculo e preparação do Master Mix para 10 reações (ICR como controle de extração e inibição)

Código do kit	Componentes do Master Mix	Quantidade por reação	10 reações (mais 10%)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µL	212,3 µL
2	<b>Enzyme Mix</b>	0,7 µL	7,7 µL
	<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

Misture o Master Mix e depois centrifugue por pouco tempo.

**Tabela 4:** Exemplo do cálculo e preparação do Master Mix para dez 10 reações (ICR apenas como controle de inibição)

Código do kit	Componentes do Master Mix	Quantidade por reação	10 reações (mais 10%)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µL	212,3 µL
2	<b>Enzyme Mix</b>	0,7 µL	7,7 µL
R	<b>Internal Control RNA</b>	1,0 µL	11 µL
	<b>Total</b>	<b>21,0 µL</b>	<b>231,0 µL</b>

Misture o Master Mix e depois centrifugue por pouco tempo.

## 9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µl do Master Mix em cada tubo de reação (placas).

**Controle negativo:** Adicione 5 µl do **No Template Control** a cada Master Mix pré-pipetado.

**Observação:** Se o **Internal Control RNA** é usado como controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, é recomendado adicionar 1 µL do **Internal Control RNA** a cada mistura de PCR do controle negativo.

**Amostras:** Adicione 5 µL eluído a cada Master Mix pré-pipetado.

**Controle positivo:** Adicione 5 µL de **Positive Control** a cada Master Mix pré-pipetado.

**Observação:** Se o **Internal Control RNA** é usado como controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, recomendamos adicionar 1 µL do **Internal Control RNA** a cada mistura de PCR do controle positivo.

Sele as placas, centrifugue brevemente em velocidade lenta e transfira para o instrumento de PCR em tempo real. Inicie o PCR de acordo com a configuração do instrumento de PCR (ver Tabela 5 e Tabela 6).

## 9.3 Configuração do instrumento de PCR

### 9.3.1 Perfil de PCR em tempo real universal

Para harmonizar os ensaios RIDA®GENE, o ensaio RIDA®GENE Pediatric Viral Panel foi verificado em perfil universal. Isto torna possível combinar os ensaios de DNA e RNA um com o outro.

**Tabela 5:** Perfil de PCR em tempo real universal para o LightCycler® 480 II

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

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

## 9.4 Configuração do canal de detecção

**Tabela 6:** Seleção dos canais de detecção adequados

Instrumento de PCR em tempo real	Deteção	Canal de deteção	Comentário
Roche LightCycler® 480 II	Rinovirus/ enterovirus/ parechovirus	465/510	É necessário o RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
	Bocavirus	533/610	
	Adenovirus	618/660	

## 10. Controle de qualidade – indicação de instabilidade ou validade de reagentes

As amostras são avaliadas usando o software de análise do instrumento de PCR em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante. Os controles negativos e positivos devem apresentar os resultados corretos (ver Tabela 7).

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.

**Tabela 7:** Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

Amostra	Resultado	ICR Ct	Gene alvo Ct
Controle positivo	Positivo	N/A *1	Ver Certificado de Análise (Certificate of Analysis)
Controle negativo	Negativo	Ct > 20	0

\*1 Um valor de Ct para o ICR não é necessário para obter um resultado positivo do controle positivo.

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

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

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 tiverem sido cumpridas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor R-Biopharm local.

## 11. Interpretação dos resultados

**Tabela 8:** Interpretação dos resultados\*

Detecção de				
Rinovirus/enterovirus/parechovirus	Bocavirus	Adenovirus	ICR	Resultado
+	-	-	+/-	Rinovirus/enterovirus/parechovirus detectáveis
-	+	-	+/-	Bocavirus detectável
-	-	+	+/-	Adenovirus detectável
+	+	-	+/-	Rinovirus/enterovirus/parechovirus e bocavirus detectáveis
+	-	+	+/-	Rinovirus/enterovirus/parechovirus e adenovirus detectáveis
-	+	+	+/-	Bocavirus e adenovirus detectáveis
+	+	+	+/-	Rinovirus/enterovirus/parechovirus; bocavirus e adenovirus detectáveis
-	-	-	+	Genes alvo não detectáveis
-	-	-	-	Inválido

\* + = positivo  
- = negativo

Uma amostra é positiva caso a amostra e o **Internal Control RNA** apresentem 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 RNA** no sistema de detecção. A detecção do **Internal Control RNA** não é necessária neste caso, porque as altas concentrações de fragmentos amplificados podem causar um sinal fraco ou ausente do **Internal Control RNA**.

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 RNA** no sistema de detecção. A inibição da reação de PCR pode ser excluída através da detecção do **Internal Control RNA**.

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



## 12. Limitações do método

1. O teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel detecta RNA de rinovirus/enterovirus/parechovirus, DNA de bocavirus, e DNA de adenovirus em esfregaços nasais/garganta humana não tratados. 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 o histórico médico e os sintomas do paciente.
3. Este teste é validado apenas a esfregaços nasais/garganta.
4. A amostragem, transporte, armazenamento e manuseio inadequados ou uma carga patogênica abaixo da sensibilidade analítica do teste podem levar a resultados falso-negativos.
5. A presença de inibidores de PCR pode levar a resultados falso-negativos ou inválidos.
6. 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.
7. 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 falso-negativos usando o RIDA®GENE Pediatric Viral Panel.
8. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Um resultado positivo indica que os genes alvo (rinovirus/enterovirus/parechovirus (5'UTR), bocavirus (5'NTR) e adenovirus (hexon)) estão presentes.
9. As substâncias dipropionato de beclometasona e di-hidrocodeína podem ter propriedades interferentes mesmo em pequenas quantidades. A partir de uma concentração de 5% [v/v], ratioAllerg® 50 µg (dipropionato de beclometasona) tem um efeito interferente na detecção do adenovirus. Gotas de Paracodin® N (di-hidrocodeína) produzem um efeito interferente na detecção de enterovirus/rinovirus/parechovirus e na detecção do IC a partir da menor concentração testada de 3,0 % [v/v].
10. Este ensaio deve ser realizado em conformidade com o regulamento sobre Boas Práticas Laboratoriais (BPL). Os usuários devem seguir precisamente as instruções do fabricante ao realizar o teste.

## 13. Características de desempenho

### 13.1 Características de desempenho clínico

#### 13.1.1 Limite de detecção do dispositivo

Para determinar o limite de detecção do dispositivo, 20 replicações de uma amostra de controle (50 cópias/reação) (rinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus, adenovirus)) foram medidas no LightCycler® 480 II. Todas as replicações foram positivas.

O limite de detecção do dispositivo é, portanto, de 50 cópias/reação.

#### 13.1.3 Especificidade analítica

##### Substâncias interferentes

A presença de inibidores de PCR e de substâncias interferentes pode levar a resultados falso-negativos ou inválidos. Portanto, os efeitos de várias substâncias que poderiam estar presentes devido ao seu amplo uso em infecções no trato respiratório ou ocorrência generalizada nas amostras de cultura de nasofaringe ou orofaringe foram investigadas.

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. Se uma potencial interferência foi encontrada nesta tela de interferência para uma substância examinada, foi estabelecida uma relação dose-efeito entre a concentração da substância em questão e a interferência.

Não foi encontrada nenhuma interferência para as substâncias listadas na Tabela 10.

**Tabela 10:** Substâncias potencialmente interferentes

Substância potencialmente interferente	Concentração
Comprimidos revestidos por película de Amoxicilina ratiopharm® 1000 mg (amoxicilina)	1 mg/mL
Comprimidos revestidos por película de Azitromicina ratiopharm® 500 mg (azitromicina)	84 mg/mL
Sangue humano	2 % [v/v]
Mucinas	60 µg/mL
Spray nasal Nasenspray ratiopharm® (xilometazolina)	10 % [v/v]
Cloreto de sódio	10 % [v/v]
Spray Neo-angin® (cloridrato de benzidamina)	10 % [v/v]
Fosfato de oseltamivir	25 mg/mL
Comprimidos 500 mg Paracetamol ratiopharm® (paracetamol)	10 mg/mL

Foram observados efeitos inibidores para as substâncias ratioAllerg® 50 µg (dipropionato de beclometasona) (5 % [v/v]) e gotas de Paracodin® N (di-hidrocodeína) (3,0 % [v/v]) (ver Limitações do método).

### Reatividade cruzada

Foram investigados vários organismos (bactérias, vírus, fungos) que são comumente encontrados na matriz de esfregaços nasais/gargantas. Os microorganismos a serem investigados para este ensaio foram escolhidos porque ou eles ocorrem naturalmente na matriz de cultura ou causam sintomas correspondentes como patógenos respiratórios. Para as análises foram usadas culturas bacterianas (entre 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> UFC\*/mL), culturas fúngicas ou virais, sobrenadantes de culturas bacterianas, virais ou fúngicas e padrões LGC e NIBSC dos organismos em particular.

O RIDA®GENE Pediatric Viral Panel multiplex real-time RT-PCR é específico para rinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus e adenovirus. Não foram detectadas reatividades cruzadas para as seguintes espécies (consulte a Tabela 11):

**Tabela 11:** Organismos com potencialmente reatividade cruzada

Organismo	Resultado do teste*		
	Rinovirus/enterovirus/parechovirus	Bocavirus	Adenovirus
<i>Acinetobacter baumannii</i> estirpe 5377	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-
<i>Bordetella parapertussis</i> estirpe 12822	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> estirpe Tohama 1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	-	-
Vírus Epstein-Barr, estirpe B95-8	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-
Vírus Herpes Simplex 1, estirpe McIntyre	-	-	-
Vírus Herpes Simplex 2, estirpe MS	-	-	-
Coronavírus humano 229E	-	-	-
Coronavírus humano OC43	-	-	-

Coronavírus humano SARS-CoV-2 (isolado: Itália-INMI1)	-	-	-
MERS-CoV estirpe: Flórida/EUA-2 Arábia Saudita 2014	-	-	-
Citomegalovírus humano	-	-	-
Metapneumovírus humano	-	-	-
Vírus parainfluenza humana 1, estirpe C35	-	-	-
Vírus parainfluenza humana 2, estirpe Greer	-	-	-
Vírus parainfluenza sorotipo 3	-	-	-
Vírus parainfluenza 4a, estirpe M-25	-	-	-
Vírus sincicial respiratório humano, estirpe longa	-	-	-
Vírus sincicial respiratório humano, estirpe 9320	-	-	-
Influenza A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	-	-	-
Influenza A/Victoria/2570/2019 (H1N1)	-	-	-
Influenza B/Washington/02/2019	-	-	-
Influenza B/Phuket/3073/2013 (linhagem Yamagata)	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> estirpe MGH 78578	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> subespécie <i>pneumophila</i>	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> estirpe FH de Agente de Eaton	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> estirpe FAM18	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> estirpe NCTC 7465	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	-	-

- = negativo

### 13.1.4 Precisão

A precisão do teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR foi determinada para os seguintes níveis de consideração.

Precisão *Intraensaio*: Determinação de cinco amostras de controle usando 20 replicações, cada uma no LightCycler® 480 II sob condições idênticas.

Precisão *Interensaio*: Determinação de cinco amostras de controle em 20 execuções em duplicidade em dez dias de trabalho (duas execuções por dia) realizadas por dois técnicos diferentes em condições reproduzíveis.

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

Os dados de precisão foram obtidos utilizando cinco amostras de controle, bem como o PTC e o NTC pertencentes ao ensaio.

O coeficiente de variação máximo obtido das medições com o teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR no LightCycler® 480 II foi de 3,16 %.

**Tabela 12:** Resultados da precisão do teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para rinovirus/enterovirus/parechovirus.

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	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
2	Ct	31,0	30,6	30,9	31,9	31,9	31,6	31,8
	CV (%)	1,11 %	1,49 %	0,75 %	2,09 %	2,43 %	2,06 %	2,23 %
3	Ct	32,0	31,9	31,8	33,3	32,8	33,0	33,0
	CV (%)	1,22 %	1,29 %	1,19 %	2,04 %	2,50 %	1,91 %	2,26 %
4	Ct	22,8	22,8	22,5	23,9	23,7	23,7	23,8
	CV (%)	1,12 %	0,96 %	0,91 %	2,87 %	3,16 %	2,45 %	2,84 %
5	Ct	26,1	25,9	26,2	27,2	26,9	27,0	27,1
	CV (%)	0,83 %	0,83 %	0,78 %	2,12 %	2,00 %	2,19 %	2,13 %

**Tabela 13:** Resultados da precisão do teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para bocavirus.

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	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Ct	30,5	30,5	30,5	30,9	30,9	30,8
	CV (%)	0,91 %	0,67 %	0,70 %	1,25 %	1,03 %	1,16 %
3	Ct	31,4	31,5	31,6	32,2	32,1	32,2
	CV (%)	0,91 %	0,77 %	1,15 %	1,24 %	1,43 %	1,83 %
4	Ct	22,5	23,0	22,6	23,5	23,4	23,4
	CV (%)	1,03 %	0,76 %	0,53 %	1,26 %	1,66 %	1,56 %
5	Ct	25,7	25,7	26,2	26,5	26,5	26,6
	CV (%)	0,69 %	0,49 %	0,74 %	1,17 %	1,15 %	0,96 %

**Tabela 14:** Resultados da precisão do teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para adenovirus.

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	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
2	Ct	31,1	31,3	31,3	31,7	31,8	31,8	31,7
	CV (%)	1,15 %	1,08 %	1,38 %	1,50 %	1,51 %	1,09 %	1,38 %
3	Ct	32,7	32,5	32,4	33,0	32,9	33,0	33,0
	CV (%)	0,87 %	0,80 %	1,11 %	2,05 %	1,39 %	1,66 %	1,72 %
4	Ct	23,7	23,9	23,6	24,3	24,4	24,4	24,4
	CV (%)	1,05 %	0,77 %	0,65 %	1,98 %	1,46 %	1,69 %	1,72 %
5	Ct	27,1	26,8	27,4	27,3	27,4	27,5	27,4
	CV (%)	0,93 %	0,83 %	0,68 %	1,85 %	1,65 %	1,23 %	1,62 %

### 13.1.5 Reatividade analítica

A reatividade do teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR foi examinada em um painel definido de estirpes/subtipos (consultar a Tabela 15).

**Tabela 15:** Testes de reatividade analítica

Estirpe	Concentração	Resultado*		
		Rinovirus/ enterovirus/ parechovirus	Bocavirus	Adenovirus
Adenovirus 1, humano, estirpe Adenoid 71 (subgrupo C)	1 x 10 <sup>-5</sup> µg/mL	-	-	+
Adenovirus 40, humano, estirpe Dugan (subgrupo F)	1,26 U/mL	-	-	+
Adenovirus 41, humano, estirpe Talk (subgrupo F)	1,17 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adenovirus tipo 2 (subgrupo C)	8,51 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adenovirus tipo 3 (subgrupo B)	1 x 10 <sup>3,23</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 4 (subgrupo E)	1,41 U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 11 (subgrupo B)	1 x 10 <sup>0,29</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 31 (subgrupo A)	1 x 10 <sup>0,15</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 37 (subgrupo D)	1 x 10 <sup>-1,98</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus estirpe tipo 5 N/A (subgrupo C)	1:100	-	-	+
Adenovirus tipo 7A (subgrupo B)	1 x 10 <sup>3,06</sup> U/mL	-	-	+
Bocavirus, HBoV1	1:10 <sup>6</sup>	-	+	-
Enterovirus A - Coxsackievirus A2 estirpe Fleetwood	1,51 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus A - enterovirus tipo 71 cepa 2003 isolada	4,57 TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Enterovirus B - Coxsackievirus B4	1 x 10 <sup>2,5</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus B - echovirus 11	5,89 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-



Enterovirus C - coxsackievirus A21, estirpe Kuykendall	1 x 10 <sup>3,29</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus C - coxsackievirus A24, estirpe DN-19	1:10 <sup>4</sup>	+	-	-
Enterovirus D - enterovirus tipo 68, estirpe 2007 isolada	1,26 x 10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Enterovirus D - enterovirus tipo 70, estirpe J670/71	1:10 <sup>5</sup>	+	-	-
Parechovirus tipo 1, estirpe Harris	3,39 x 10 <sup>4</sup> U/mL	+	-	-
Parechovirus tipo 3	4,07 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rinovirus tipo 1A	4,17 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Rinovirus A16	1,26 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Rinovirus A80	1,17 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Rinovirus B14	1,05 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rinovirus B42	2,45 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Rinovirus B70	1,70 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-

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










- = negativo

#### 14. Histórico de versões






Número da versão	Seção e designação
2022-03-03	Versão da edição

## 15. Explicação de símbolos

### Símbolos gerais

	Para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consulte o manual de operação
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de armazenamento
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

### Símbolos específicos do teste

	Reaction Mix
	Enzyme Mix
	Controle de extração/inibição
	Controle negativo
	Controle positivo

## 16. Referências

1. Brini I, Guerrero A, Hannachi N, Bouguila J, Orth-Höller D, Bouhlel A, u. a. Epidemiology and clinical profile of pathogens responsible for the hospitalization of children in Sousse area, Tunisia. *PloS One*. 2017;12(11):e0188325.
2. Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. Oktober 2018;24(10):1055-63.
3. Ma X, Conrad T, Alchikh M, Reiche J, Schweiger B, Rath B. Can we distinguish respiratory viral infections based on clinical features? A prospective pediatric cohort compared to systematic literature review. *Rev Med Virol*. September 2018;28(5):e1997.
4. Mummidi PS, Tripathy R, Dwibedi B, Mahapatra A, Baraha S. Viral aetiology of wheezing in children under five. *Indian J Med Res*. Februar 2017;145(2):189-93.
5. Sonawane AA, Shastri J, Bavdekar SB. Respiratory Pathogens in Infants Diagnosed with Acute Lower Respiratory Tract Infection in a Tertiary Care Hospital of Western India Using Multiplex Real Time PCR. *Indian J Pediatr*. Mai 2019;86(5):433-8.
6. PERCH study group (The Pneumonia Etiology Research for Child Health Study Group). Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study. *Lancet Lond Engl*. 31. August 2019;394(10200):757-79.
7. Robert-Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 22/2019. 29. Mai 2019;6.
8. Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. *Microbiol Spectr*. August 2016;4(4).
9. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, u. a. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 21. Oktober 2016;22(39):8684-97.
10. Christensen A, Kesti O, Elenius V, Eskola AL, Døllner H, Altunbulakli C, u. a. Human bocaviruses and paediatric infections. *Lancet Child Adolesc Health*. Juni 2019;3(6):418-26.
11. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol*. Januar 2012;22(1):46-64.
12. Greenberg SB. Update on rhinovirus and coronavirus infections. *Semin Respir Crit Care Med*. August 2011;32(4):433-46.
13. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol*. Januar 2015;235(2):217-28.
14. Messacar K, Abzug MJ, Dominguez SR. The Emergence of Enterovirus-D68. *Microbiol Spectr*. Juni 2016;4(3).

15. To KKW, Yip CCY, Yuen K-Y. Rhinovirus - From bench to bedside. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*. Juli 2017;116(7):496-504.
16. Hayes A, Nguyen D, Andersson M, Antón A, Bailly J-L, Beard S, u. a. A European multicentre evaluation of detection and typing methods for human enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *J Med Virol*. August 2020;92(8):1065-74.
17. Simonen-Tikka M-L, Klemola P, Suomenrinne S, Kajjalainen S, Söderström D, Savolainen-Kopra C, u. a. Virus infections among young children--the first year of the INDIS study. *J Med Virol*. September 2013;85(9):1678-84.
18. Cox DW, Le Souëf PN. Rhinovirus and the developing lung. *Paediatr Respir Rev*. September 2014;15(3):268-74.
19. Chen B-C, Chang J-T, Huang T-S, Chen J-J, Chen Y-S, Jan M-W, u. a. Parechovirus A Detection by a Comprehensive Approach in a Clinical Laboratory. *Viruses*. 12. Dezember 2018;10(12).
20. McNeale D, Wang CYT, Arden KE, Mackay IM. HPeV-3 predominated among Parechovirus A positive infants during an outbreak in 2013-2014 in Queensland, Australia. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2018;98:28-32.
21. Piralla A, Furione M, Rovida F, Marchi A, Stronati M, Gerna G, u. a. Human parechovirus infections in patients admitted to hospital in Northern Italy, 2008-2010. *J Med Virol*. April 2012;84(4):686-90.
22. Sillanpää S, Oikarinen S, Sipilä M, Seppälä E, Nurminen N, Rautiainen M, u. a. Human parechovirus as a minor cause of acute otitis media in children. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2015;62:106-9.
23. Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, u. a. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. September