

RIDA® GENE Parainfluenza

REF PG5805



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

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



1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. Il test RIDA®GENE Parainfluenza, eseguito su Roche LightCycler® 480 II, è un test RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dell'RNA dei virus parainfluenzali 1, 3 e 2/4 in tamponi umani nasali/faringei non trattati da soggetti che presentano segni e sintomi di infezione respiratoria acuta.

Il test RIDA®GENE Parainfluenza è concepito per supportare la diagnosi delle infezioni da virus parainfluenzali (parainfluenza 1, parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4) in pazienti con sintomi di infezione respiratoria in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono l'infezione da virus parainfluenzali (parainfluenza 1, parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4) e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi.

Il prodotto è destinato all'uso professionale.

2. Sintesi e spiegazione del test

I virus parainfluenzali umani (HPIV) sono virus rivestiti a filamento singolo di RNA della famiglia *Paramyxoviridae*⁽¹⁻³⁾. Possono causare diverse malattie respiratorie, infettando inizialmente l'epitelio pseudostratificato mucociliare delle vie aeree del naso e dell'orofaringe, prima di diffondersi alle grandi e piccole vie aeree⁽¹⁾. Gli HPIV sono la seconda causa di ricoveri nei bambini sotto i 5 anni⁽²⁾ e fino al 17 % dei ricoveri originano da queste infezioni⁽³⁾.

Gli HPIV si suddividono dal punto di vista genetico e antigenico in quattro sierotipi che possono infettare l'uomo: HPIV-1, HPIV-2, HPIV-3 e HPIV-4^(1, 2). HPIV-1 e HPIV-3 appartengono al genere *Respirovirus*, mentre HPIV-2 e HPIV-4 sono classificati nel genere *Rubulavirus*^(1, 3). Il quadro clinico varia a seconda del tipo: HPIV-1 e HPIV-2 spesso causano croup e sintomi simili all'influenza, mentre HPIV-3 è comunemente associato a polmonite e bronchiolite. Finora HPIV-4 non è ben caratterizzato, ma si sospetta che abbia un quadro clinico simile ad HPIV-3⁽²⁾. Anche il modello stagionale è diverso tra i quattro sierotipi: HPIV-1 colpisce di solito nell'autunno degli anni dispari, mentre HPIV-2 colpisce nell'autunno degli anni pari. Le infezioni da HPIV-3 colpiscono ogni anno da aprile a giugno⁽²⁾ e per questo sono la principale causa di infezioni clinicamente significative tra i virus parainfluenzali⁽¹⁾. Per esempio, il 60 % dei bambini di 2 anni sono infettati da HPIV-3, mentre il numero sale all'80 % tra i bambini fino a 4 anni⁽³⁾. Generalmente i neonati, i bambini, gli anziani e gli immunocompromessi presentano un rischio maggiore di contrarre un'infezione da HPIV in forma grave, mentre negli adulti sani solitamente si verificano sintomi lievi a carico delle vie aeree superiori^(2, 3). La trasmissione dell'HPIV da uomo a uomo avviene normalmente attraverso la tosse e gli starnuti, il contatto ravvicinato con persone infette o toccando oggetti contaminati dall'HPIV e poi portando le mani alla bocca, agli occhi o al naso⁽⁴⁾.

3. Principio del test

RIDA®GENE Parainfluenza è un test RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dei virus parainfluenzali 1, 3 e 2/4 in tamponi umani nasali o faringei.

Dopo l'isolamento dell'RNA, i frammenti del gene specifico (se presenti) di parainfluenza 1, parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4 (gene HN) vengono amplificati. 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 di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA®GENE Parainfluenza contiene un **Internal Control RNA** (ICR) per 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

RIF	Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
PGZ5805RM	1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	giallo, pronto per l'uso
PGZ5805EM	2	Enzyme Mix	1 ×	80 µL	rosso, pronto per l'uso
PGZ5805IC	R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µL	marrone, pronto per l'uso
PGZ5805NC	N	No Template Control	1 ×	450 µL	bianco, pronto per l'uso
PGZ5805PC	P	Positive Control	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 - 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 - 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 scongelamento-congelamento

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

6.1 Contenuto della confezione

I seguenti reagenti sono necessari per eseguire il test RIDA®GENE Parainfluenza:

Reagenti
Acqua per PCR (priva di nucleasi)

6.2 Attrezzatura di laboratorio

Per eseguire il test RIDA®GENE Parainfluenza occorre la seguente attrezzatura:

Attrezzatura
Piattaforma di estrazione: strumento MagNA Pure 96 (Roche)
Strumento per la 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, 100-1.000 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.

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 incrociata e risultati falsi positivi è necessario utilizzare stanze separate nonché speciali indumenti e strumenti per l'estrazione, la preparazione della PCR e la PCR.

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

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 combinare 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 responsabili del corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

I materiali pericolosi sono indicati in base ai requisiti di etichettatura. Per ulteriori dettagli, consultare le schede dei dati di sicurezza (SDS).

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

Il riassunto sulla sicurezza e sulle prestazioni (SSP) di questo prodotto sarà disponibile su <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> una volta che verrà avviato il database europeo sui dispositivi medici (EUDAMED). Nel database, cercare il dispositivo usando l'UDI-DI che si trova sull'imballaggio esterno del dispositivo.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

8.1 Preparazione dell'RNA da tamponi nasali e faringei

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

Il test RIDA®GENE Parainfluenza 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 di inibizione oppure come processo di controllo dell'estrazione e come controllo di inibizione.

Quando si deve utilizzare l' **Internal Control RNA** solo come controllo di inibizione per l'amplificazione, è necessario aggiungere 1 µL di **Internal Control RNA** alla Master Mix (Tabella 4).

Quando si deve utilizzare l' **Internal Control RNA** 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**. Se possibile, si consiglia di aggiungere l'Internal Control RNA alla cartuccia del campione prima di aggiungere il campione. Raccomandiamo di pipettare 1 µL di **Internal Control RNA** per reazione alla 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.

L'aggiunta di un ulteriore 10% di volume alla Master Mix è consigliata per compensare eventuali perdite di pipettaggio (vedere Tabella 3 e Tabella 4). Prima dell'uso, scongelare la **Reaction Mix**, l'**Enzyme Mix**, il **Positive Control**, il **No Template Control** e l'**Internal Control RNA** e miscelare mediante agitatore a vortice (tranne l'Enzyme Mix), quindi centrifugare brevemente. I reagenti devono essere sempre adeguatamente raffreddati durante le fasi di lavoro (2 °C - 8 °C).

Tabella 3: Esempio di calcolo e produzione 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	Reaction Mix	19,3 µL	212,3 µL
2	Enzyme Mix	0,7 µL	7,7 µL
	Totale	20 µL	220 µL

Miscelare 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	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
	Totale	21,0 µL	231,0 µL

Miscelare 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: pipettare 5 µL di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

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: dispensare 5 µL di eluato nella rispettiva Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: dispensare 5 µL di **Positive Control** nella rispettiva Master Mix.

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 RT-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 per PCR (Tabella 5 e Tabella 6).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo per PCR real-time universale

Per armonizzare i test RIDA®GENE, il test RIDA®GENE Parainfluenza è stato verificato nel profilo universale. Questo rende possibile combinare tra loro i test del DNA e dell'RNA. Pertanto la trascrizione inversa è al primo posto nel profilo universale.

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

<u>Trascrizione inversa</u>	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 di PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Commento
Roche LightCycler® 480 II	Virus parainfluenzale 1	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	533/580	
	Virus parainfluenzale 3	533/610	
	Virus parainfluenzale 2/4	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 disponibile a una concentrazione di 10^3 copie/ μ L. Viene utilizzato in una quantità totale di 5×10^3 copie in ogni esecuzione di PCR.

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

Campione	Risultato	Ct ICR	Gene Ct target
Controllo positivo	+	N/A *1	Vedere il Certificate of Analysis
Controllo 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
- Procedura di esecuzione del test corretta

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

11. Interpretazione del risultato

Al momento, non esiste un metodo di riferimento riconosciuto a livello internazionale o un materiale di riferimento per la standardizzazione. I materiali di controllo possono essere tracciati metrologicamente sugli standard interni di R-Biopharm AG sulla base di specifici amplificati di RNA.

Per ulteriori informazioni sulla tracciabilità metrologica, contattare R-Biopharm AG.

Nel certificato di analisi allegato (CoA), si possono trovare i valori regolati, le fluttuazioni e ulteriori dettagli.

I dati sono valutati in LightCycler® 480 II utilizzando il metodo del punto di adattamento. I segnali superiori alla soglia sono considerati un risultato positivo.

Per determinare il limite di rivelazione (LoD 95 %) (sezione 13.2.1), la soglia è stata impostata come segue:

Rivelazione	Soglia elevata (% di fluorescenza totale)
Virus parainfluenzale 1	2,39 %
Virus parainfluenzale 2	20,21 %
Virus parainfluenzale 3	9,09 %
Parainfluenza 4A	6,62 %

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 8.

Tabella 8: Interpretazione del risultato

Rivelazione di			ICD	Risultato
Virus parainfluenzale 1	Virus parainfluenzale 3	Virus parainfluenzale 2/4		
+	-	-	+/-	Parainfluenza 1 rivelabile
-	+	-	+/-	Parainfluenza 3 rivelabile
-	-	+	+/-	Parainfluenza 2/4 rivelabile
+	+	-	+/-	Parainfluenza 1 e parainfluenza 3 rivelabili
+	-	+	+/-	Parainfluenza 1 e parainfluenza 2/4 rivelabili
-	+	+	+/-	Parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4 rivelabili
+	+	+	+/-	Parainfluenza 1, parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4 rivelabili
-	-	-	+	Geni target non rivelabile
-	-	-	-	Non valido

* + = positivo
 - = negativo

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

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

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

Un campione non è valido se né l'RNA del campione né l' **Internal Control RNA** mostrano 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 Parainfluenza rivela l'RNA dei virus parainfluenza 1, parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4 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. Campionamento, trasporto, conservazione e manipolazione impropri o un carico di patogeni inferiore alla sensibilità analitica del test possono portare a risultati 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 estremamente basse delle sequenze target, sotto il limite di rivelazione (LoD 95 %), ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.
7. Mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione di varianti nuove o sconosciute e possono portare a risultati falsi negativi con RIDA®GENE Parainfluenza.
8. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un risultato positivo indica la presenza dei geni target (parainfluenza 1, parainfluenza 3, e parainfluenza 2/4 (gene HN)).
9. Sangue umano e paracodina (diidrocodeina) possono avere proprietà interferenti, anche in piccole quantità. Il sangue umano interferisce a partire da una concentrazione del 2,4 % [v/v]. La paracodina (diidrocodeina) interferisce a partire da una concentrazione del 3 % [v/v].
10. Questo test deve essere eseguito in conformità con il regolamento sulla buona pratica di laboratorio (BPL). Durante l'esecuzione del test, l'operatore deve seguire attentamente le istruzioni del produttore.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Prestazioni e caratteristiche analitiche

13.1.1 Limite di rivelazione (LoD 95 %)

Il LoD è stato determinato misurando un campione di controllo positivo (tamponi nasali/faringei negativi, arricchiti) in cinque fasi di diluizione (in fasi di 0,25 log) per ogni target e matrice con 20 replicati per fase in un lotto. Ha fatto seguito un'analisi probit. Successivamente, il LoD calcolato è stato confermato con 20 replicati per target e matrice per la fase/concentrazione di diluizione calcolata.

Per i test sono stati utilizzati i seguenti ceppi:

Parainfluenza 1: ZeptoMetrix (#0810014CF)

Parainfluenza 2: ZeptoMetrix (#0810015CF)

Parainfluenza 3: ZeptoMetrix (#0810014CF)

Parainfluenza 4a: ZeptoMetrix (#0810060CF)

Per la rivelazione dell'RNA dei virus parainfluenza 1, parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4 utilizzando il test RIDA®GENE Parainfluenza, lo strumento MagNA Pure 96 e il Light Cycler® 480 II, sono stati determinati i seguenti limiti di rivelazione (LoD).

I risultati di queste misurazioni sono presentati nella Tabella 9.

Tabella 9: Risultati del limite di rivelazione del test RIDA®GENE Parainfluenza per i parametri Parainfluenza 1, Parainfluenza 3 e Parainfluenza 2/4

	Virus parainfluenzale 1	Virus parainfluenzale 2	Virus parainfluenzale 3	Virus parainfluenzale 4
LoD	0,05 [TCID ₅₀ /mL]	354,00 [TCID ₅₀ /mL]	3,69 [TCID ₅₀ /mL]	67,61 [TCID ₅₀ /mL]

Il LoD per il parametro Parainfluenza 1 nei tamponi nasali/faringei è stato determinato a 0,05 [TCID₅₀*/mL].

Il LoD per il parametro Parainfluenza 2 nei tamponi nasali/faringei è stato determinato a 354,00 [TCID₅₀*/mL].

Il LoD per il parametro Parainfluenza 3 nei tamponi nasali/faringei è stato determinato a 3,69 [TCID₅₀*/mL].

Il LoD per il parametro Parainfluenza 4 nei tamponi nasali/faringei è stato determinato a 67,61 [TCID₅₀*/mL].

13.1.2 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) 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 RT-PCR e 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 del tratto respiratorio o a causa della loro presenza diffusa nei campioni corrispondenti.

Le sostanze che potrebbero influenzare significativamente i risultati del test sono state prima esaminate in un'analisi di interferenza. Inizialmente sono state esaminate varie sostanze che potrebbero essere presenti come residui dell'estrazione, a causa dell'uso diffuso nelle infezioni respiratorie (vari farmaci da banco o soggetti a prescrizione), oppure a causa della presenza diffusa nei campioni di controllo (ad es. mucine sulla superficie delle mucose o sangue) in concentrazioni elevate (tre volte la dose giornaliera o la simulazione del "caso peggiore"). 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
Amoxicillina	1 mg/mL
Etanolo*	5 % [v/v]
Guanidina cloridrato*	5 % [p/v]
Mucina	60 µg/mL
Mucosolvan	10 % [v/v]
Nasivin/ossimetazolina	10 % [v/v]
Cloruro di sodio	10 % [v/v]
Oseltamivir	25 mg/mL
Paracetamolo	10 mg/mL

* in base al volume dell'eluato

Sono stati osservati effetti inibitori per il sangue umano (2,4 %) e la paracodina (diidrocodeina) (3 %) (vedere i limiti del metodo).

Reattività crociata

Sono stati esaminati vari organismi comunemente presenti nei tamponi nasali/faringei (batteri, parassiti, funghi e virus). I microrganismi da studiare per questo test sono stati scelti perché o si trovano naturalmente nei tamponi nasali/faringei o causano sintomi corrispondenti ai patogeni respiratori. Per le analisi sono state utilizzate colture batteriche, fungine o virali; surnatanti di colture batteriche, fungine o virali e standard LGC e NIBSC dei rispettivi organismi.

Il test PCR real-time multiplex RIDAGENE®Parainfluenza è specifico per i virus parainfluenza 1, parainfluenza 3 e parainfluenza 2/4. Non sono state rivelate reattività incrociate con le seguenti specie (vedere Tabella 11):

Tabella 11: Organismi potenzialmente cross-reattivi

Organismo	Risultato del test*		
	Virus parainfluenzale 1	Virus parainfluenzale 3	Virus parainfluenzale 2/4
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	-	-
Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	-	-
Enterovirus tipo 71	-	-	-
Virus di Epstein-Barr B95-8	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-
Coronavirus 229E umano	-	-	-
Coronavirus OC43 umano	-	-	-
Coronavirus NL63 umano	-	-	-
Metapneumovirus umano	-	-	-
Influenza A H1N1 Brisbane/59/07	-	-	-
Influenza A H3N2 Texas/50/12	-	-	-
Influenza B/Washington/02/2019	-	-	-
Virus dell'influenza B/Colorado/6/2017	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	-
<i>Lactobacillus crispatus</i> ceppo VPI3199	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	-	-

MERS-CoV	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , ceppo (FH di agente Eaton)	-	-	-
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (NATtrol Recombinant External Run Control)	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Rhinovirus 1A ceppo MRC-5	-	-	-
RSV (ceppo Long)	-	-	-
RSV (ceppo 9320)	-	-	-
SARS	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (NCTC 7465)	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-

* - = negativo

13.1.4 Precisione

La precisione del test RT-PCR RIDA®GENE Parainfluenza è stata determinata per i seguenti livelli di considerazione.

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 cicli in duplicato in 10 giorni di lavoro (2 cicli al giorno) eseguite da due tecnici diversi in condizioni riproducibili.

Precisione *inter*-lotto: 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.

I coefficienti di variazione ottenuti di ogni misurazione utilizzando il test di PCR real-time RIDA®GENE Parainfluenza su LightCycler® 480 II sono stati inferiori al 3,06 %.

Tabella 12: Risultati di precisione per il test RIDA®GENE Parainfluenza per il virus parainfluenza 1.

Ct	Valore medio/ 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	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	non disponibili	non disponibili	non disponibili	non disponibili	non disponibili	non disponibili	non disponibili
2	Ct	30,9	30,7	30,8	30,8	30,6	30,5	30,6
	CV (%)	0,68 %	0,78 %	0,82 %	1,06 %	1,07 %	1,01 %	1,11 %
3	Ct	31,1	30,7	30,9	30,6	30,5	30,5	30,6
	CV (%)	0,91 %	1,06 %	1,13 %	1,19 %	0,91 %	0,90 %	0,99 %
4	Ct	27,3	27,0	27,1	26,9	26,9	27,0	26,9
	CV (%)	0,57 %	1,09 %	0,70 %	1,28 %	1,39 %	1,30 %	1,32 %
5	Ct	23,4	23,7	23,8	23,7	23,6	23,7	23,6
	CV (%)	0,87 %	1,19 %	0,65 %	1,39 %	1,51 %	1,25 %	1,39 %

Tabella 13: Risultati di precisione per il test RIDA®GENE Parainfluenza per il virus parainfluenza 3.

Ct	Valore medio/ 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	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
2	Ct	31,3	31,1	30,8	30,8	30,8	30,5	30,7
	CV (%)	0,74 %	1,03 %	1,30 %	1,55 %	1,37 %	1,16 %	1,45 %
3	Ct	32,2	31,9	31,7	31,3	31,6	31,5	31,5
	CV (%)	0,92 %	1,33 %	1,03 %	2,04 %	1,39 %	1,44 %	1,69 %
4	Ct	26,0	25,7	25,5	25,0	25,4	25,2	25,2
	CV (%)	1,06 %	1,57 %	1,17 %	2,78 %	2,61 %	1,85 %	2,51 %
5	Ct	22,5	22,7	21,9	21,8	22,0	21,9	21,9
	CV (%)	1,12 %	1,48 %	1,39 %	2,63 %	2,32 %	1,98 %	2,35 %

Tabella 14: Risultati di precisione per il test RIDA®GENE Parainfluenza per il virus parainfluenza 2/4.

Ct	Valore medio /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	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	non disponibili	non disponibili	non disponibili	non disponibili	non disponibili	non disponibili	non disponibili
2	Ct	31,6	32,0	31,6	32,1	31,5	31,6	31,7
	CV (%)	1,29 %	1,44 %	2,46 %	1,55 %	2,02 %	1,90 %	2,05 %
3	Ct	31,9	32,2	32,2	31,8	31,9	31,8	31,8
	CV (%)	1,88 %	3,06 %	2,60 %	2,11 %	2,12 %	2,30 %	2,14 %
4	Ct	27,0	26,9	26,8	26,5	26,6	26,9	26,7
	CV (%)	1,48 %	2,66 %	2,42 %	2,46 %	2,92 %	2,13 %	2,56 %
5	Ct	22,7	23,6	23,3	23,2	23,1	23,1	23,1
	CV (%)	1,30 %	2,05 %	2,03 %	1,90 %	2,86 %	2,28 %	2,38 %

13.1.5 Reattività analitica

La reattività del test PCR real-time multiplex RIDA®GENE Parainfluenza è stata studiata utilizzando vari ceppi di virus parainfluenzali (vedere Tabella 15).

Tabella 15: Test di reattività analitica

Ceppo	Concentrazione	Risultato*		
		Virus parainfluenzale 1	Virus parainfluenzale 3	Virus parainfluenzale 2/4
Virus parainfluenzale 1 C35	0,417 ng	+	-	-
Virus parainfluenzale 2 Greer	0,01005 ng	-	-	+
Virus parainfluenzale 3 C243	0,0201 ng	-	+	-
Virus parainfluenzale 4a M-25	10 ^{3,25} TCID50/0,2 mL	-	-	+
Virus parainfluenzale 4b CH 19503	1,524 ng	-	-	+

* + = positivo
- = negativo

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e denominazione
2021-10-27	Versione precedente
2022-01-20	Revisione generale: 4.Contenuto della confezione

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Uso per la diagnostica in vitro
	Attenersi alle istruzioni per l'uso
	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. Russell E, Ison MG. Parainfluenza Virus in the Hospitalized Adult. Clin Infect Dis. 2017;65(9):1570-6.
2. DeGroot NP, Haynes AK, Taylor C, Killerby ME, Dahl RM, Mustaqim D, et al. Human parainfluenza virus circulation, United States, 2011-2019. J Clin Virol. 2020;124:104261.
3. Pawełczyk M, Kowalski ML. The Role of Human Parainfluenza Virus Infections in the Immunopathology of the Respiratory Tract. Curr Allergy Asthma Rep. 2017;17(3):16.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Human Parainfluenza Viruses (HPIVs) - Transmission 2019 [Available from: <https://www.cdc.gov/parainfluenza/about/transmission.html>.] 15.10.2021