

RIDA® GENE Enterovirus

REF PG4705



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



Deutsch	3
English.....	21
Español.....	39
Français.....	59
Italiano	79

RIDA® GENE Enterovirus

REF PG4705

1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA® GENE Enterovirus ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Enteroviren aus humanen Stuhlproben und Liquor.¹

Die RIDA® GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR soll die Diagnose einer durch Enteroviren (Polioviren, Echoviren, Coxsackieviren, humane Enteroviren 70/71) verursachten Erkrankung unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Enteroviren gehören zur Familie der *Picornaviridae* und werden nach aktueller Klassifikation in 15 Spezies (Enterovirus A-L und Rhinovirus A-C) unterteilt, wobei die Spezies Enterovirus E-L nicht als humanpathogen beschrieben sind.^{2,3,4} Zur Spezies der Enteroviren A gehören neben den humanen Enteroviren A auch die Coxsackie-Viren A, während die Spezies der Enteroviren B neben den humanen Enteroviren B auch die Coxsackie-Viren B sowie die Echoviren umfasst. Weiterhin sind Coxsackie-Viren C und Polioviren sowie die humanen Enteroviren C der Spezies der Enteroviren C zugeordnet.^{2,3,4} Enteroviren infizieren hauptsächlich Säuglinge und Kleinkinder und können über den fäkal-oralen Weg übertragen werden und seltener auch über Tröpfcheninfektion und kontaminiertes Wasser. Die meisten Enterovirus-Infektionen verlaufen asymptomatisch oder mit milden erkältungsähnlichen Symptomen. Durch die Vielzahl der Enterovirus-Spezies ist das Krankheitsbild bei schweren symptomatischen Erkrankungen jedoch breit gefächert. So können Infektionen mit Enteroviren auch Kinderlähmung, die Hand-Fuß-Mund-Krankheit sowie Meningitis und Myokarditis hervorrufen.⁴

Polioviren sind einzelsträngige RNA- (ss-RNA) Viren und waren vor ihrer teilweisen Ausrottung durch Impfung weltweit verbreitet. Neben milden Symptomen wie Fieber und Husten kann das Poliovirus auch Kinderlähmung (Poliomyelitis) hervorrufen. Obwohl immer wieder einzelne Ausbrüche von Poliomyelitis gemeldet werden, sind die Fallzahlen weltweit rückläufig. So wurden 2016 nur noch 37 Infektionen mit Poliovirus Typ 1 und keine mit Poliovirus Typ 3 gezählt. Poliovirus Typ 2 gilt seit September 2015 als ausgerottet.⁵

Coxsackie-Virus A und B wurden 1984 das erste Mal gemeldet und nach ihrem Entdeckungsort Coxsackie, New York benannt. Coxsackie-Viren sind weltweit verbreitet und beide Stämme können zu der sogenannten „Sommergrippe“ führen. Die Hand-Fuß-Mund-Krankheit wird in den USA am häufigsten durch Coxsackie-Virus A16 hervorgerufen während andere schwerwiegende Coxsackie-Virus-Erkrankungen Konjunktivitis und Myokarditis sind. Neben Coxsackie-Viren führt auch eine Infektion mit humanem Enterovirus 70 zu einer schweren Konjunktivitis.^{6,7} Das humane Enterovirus 71 kann zur Hand-Fuß-Mund-Krankheit führen, eine Infektion mit Enterovirus 71 verläuft aber zu großen Teilen asymptomatisch. Dieses einzelsträngige RNA-(ss-RNA) Virus ist weltweit verbreitet und tritt vor allem im Spätsommer und Herbst auf.^{4,9} Echovirus ist hoch infektiös und kommt häufig bei Kindern vor. Eine Infektion mit Echoviren kann unter anderem zu einer aseptischen Meningitis führen, wobei Echovirus 30 der in Europa, Amerika und Asien am häufigsten vorkommende Serotyp dieser Erkrankung ist.⁸

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE Enterovirus ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Enterovirus-RNA in humanen Stuhlproben und Liquor. Der Nachweis erfolgt im One-Step real-time RT-PCR Format, d.h. die reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA wird dabei mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die für Enterovirus spezifischen Genfragmente werden anschließend mittels real-time RT-PCR amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen (5'-UTR) werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem 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 Enterovirus Test enthält eine Internal Control RNA (ICR), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

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

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können 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 Testeigenschaften 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).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE Enterovirus real-time RT-PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab. 2: Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, LightCycler®480z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und LightCycler® 480z
- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler® 2.0
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-frei)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

- Dieser Test ist nur von geschultem 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 von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- 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 siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 RNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die RNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches RNA-Extraktionskit (z.B. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) oder RNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) für Stuhlproben empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:10 mit PCR-Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 1 min bei 13.000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA®GENE Enterovirus 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 Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control RNA** nur als Inhibitionskontrolle 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 verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control RNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control RNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control RNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

8.2 RNA-Präparation aus Liquor

Für die RNA-Isolierung aus Liquor wird ein kommerziell erhältliches RNA-Extraktionskit (z.B. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) oder RNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) für Liquorproben empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA®GENE Enterovirus 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 Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control RNA** nur als Inhibitionskontrolle 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 verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control RNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control RNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl 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, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet 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
	Gesamt	20 µl	220 µl

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
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des RT-PCR-Mix

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

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

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control RNA zum RT-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: Wir empfehlen bei Verwendung der Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control RNA zum RT-PCR Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

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

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 Universal real-time RT-PCR Profil

Tab. 5: Universal real-time RT-PCR Profil für LightCycler® Serie

<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.

Tab. 6: Universal real-time RT-PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

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

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil kann auch für DNA Tests verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 7: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 2.0	Enterovirus	530	RIDA®GENE Color Compensation II (PG0002) wird benötigt
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Enterovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480z	Enterovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	540/580	
Agilent Techn. Mx3005P	Enterovirus	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICR	HEX	
ABI 7500	Enterovirus	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Enterovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Enterovirus	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein
	ICR	Yellow	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8, Abb. 1).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Tab. 8: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA *1	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

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

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht positiv ist, 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

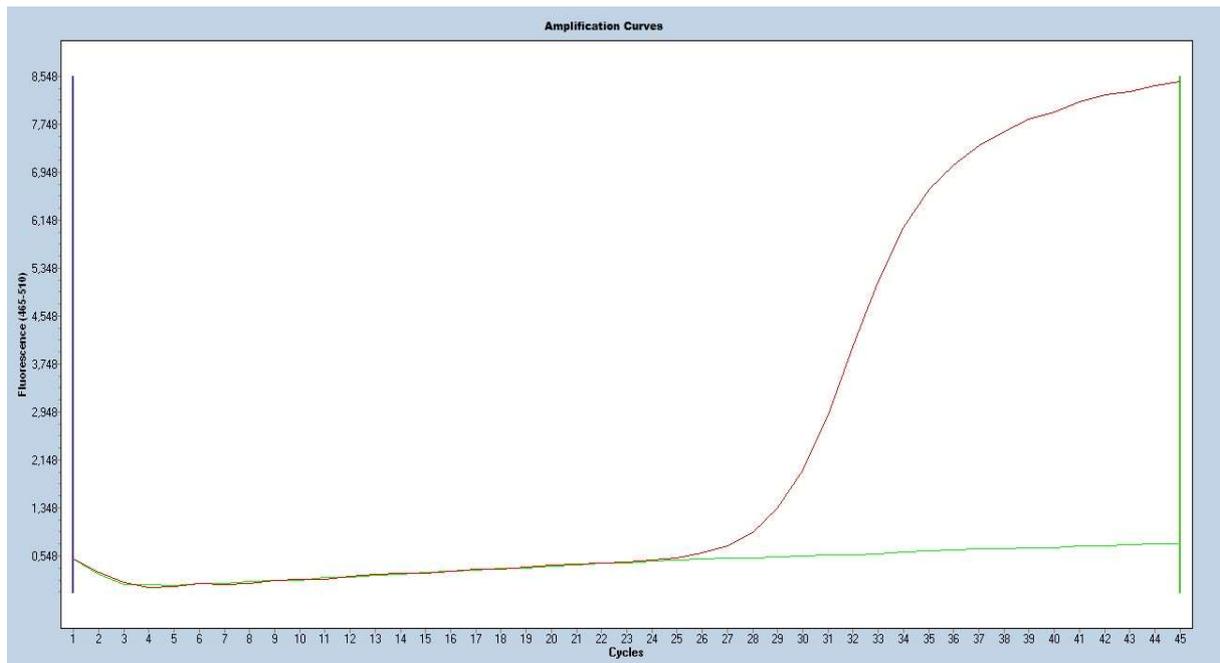


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (Enterovirus) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Interpretation der Ergebnisse

Zielgen		
Enterovirus	ICR	Ergebnis
positiv	positiv/negativ	Enterovirus nachweisbar
negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	Ungültig

Enterovirus ist nachweisbar, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation zeigt und eine Amplifikation für die Internal Control RNA im Nachweissystem zu sehen ist.

Enterovirus ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die Internal Control RNA im Nachweissystem zeigt. 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.

Enterovirus ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation, aber die Internal Control RNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine

Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control RNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-RNA für Enterovirus und die Internal Control RNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Stuhlproben und Liquor geeignet.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Viruslast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE Enterovirus zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (5'-UTR) vorhanden sind.
8. Rhinoviren gehören zur Familie der *Picornaviridae*. Aufgrund überlappender Sequenzen kann nicht ausgeschlossen werden, dass der RIDA®GENE Enterovirus Test eine Querempfindlichkeit zu Rhinoviren zeigt.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Klinische Leistungsmerkmale

In einer retrospektiven klinischen Validierungsstudie wurden 124 extrahierte Stuhl- und Liquorproben mit dem RIDA®GENE Enterovirus Test und einer in-house real-time PCR an einem Institut in Deutschland untersucht.

Tab. 10: Korrelation der Enterovirus-Ergebnisse mit der RIDA®GENE Enterovirus real-time RT-PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Enterovirus	Positiv	40	0	40	PPV: 100,0 %
	Negativ	1	83	84	NPV: 98,8 %
	Insgesamt	41	83	124	

13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 50 RNA-Kopien/Reaktion für Enterovirus.

Die folgende Abbildung 2 zeigt eine Verdünnungsreihe von Enterovirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II.

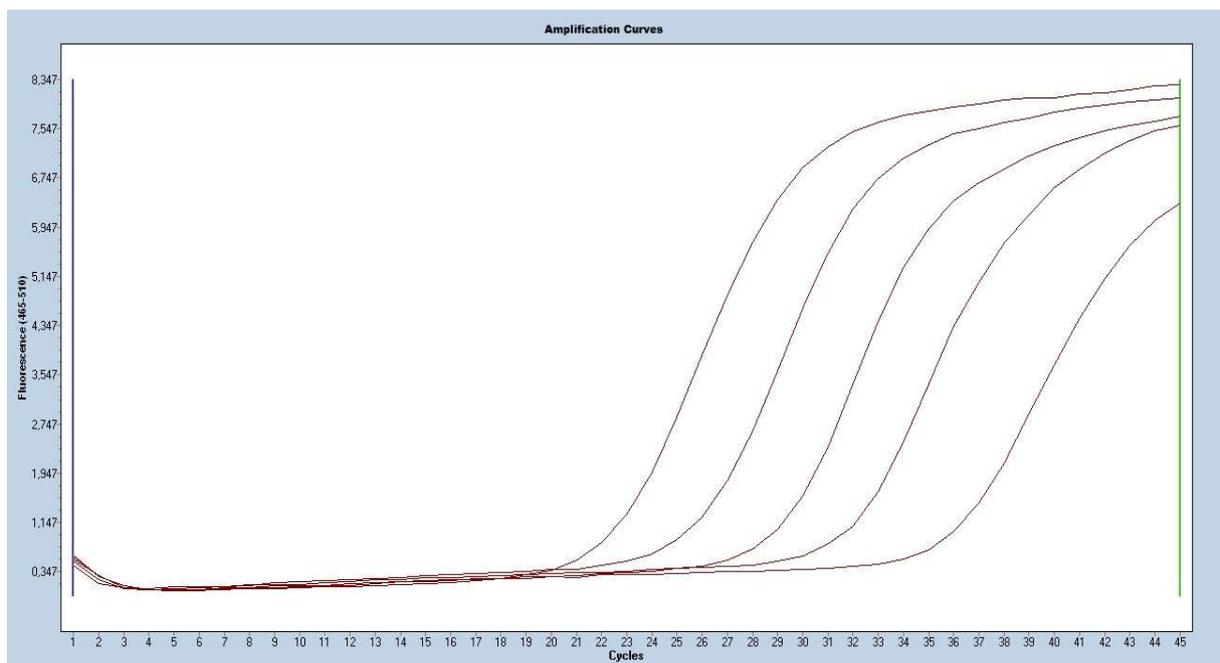


Abb. 2: Verdünnungsreihe Enterovirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, der RNA-Extraktion und dem RNA-Gehalt.

13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für Enterovirus. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 11):

Tab. 11: Kreuzreaktivitätstestung

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	Respiratory syncytial virus, human, strain Long	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	Respiratory syncytial virus, human, strain 9320	-
Adenovirus 41, Human, Strain Tak	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	Rhinovirus, human, Genogruppe A	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	Influenza virus A/PR/8/34	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Astrovirus	-	Coronavirus 229E, human	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Metapneumovirus, human	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Cytomegalovirus, human	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Norovirus GG I	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Norovirus GG II	-	<i>Staphylococcus hominis</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	Parainfluenza virus 1, human, strain C35	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Parainfluenza virus 2, human, strain Greer	-	Varicella Zoster Virus (Type B)	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Parainfluenza virus, serotype 3	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-

<i>Candida albicans</i>	-	Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	Parainfluenza virus 4b, human, strain CH19503	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-				

13.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR wurde mit verschiedenen Stämmen der Gattung Enterovirus untersucht (s. Tab. 12). Alle Stämme des Probenpanels wurden mit der RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR oder mittels Sequenzabgleich (*) nachgewiesen.

Tab. 12: Analytische Reaktivitätstestung

Enterovirus					
Enterovirus A					
Enterovirus type 71	+	Coxsackievirus A9	+		
Enterovirus B					
Coxsackievirus B1	+	Coxsackievirus B2	+	Coxsackievirus B3	+
Coxsackievirus B4	+	Coxsackievirus B5	+	Echovirus type 6	+
Echovirus type 7	+	Echovirus type 11	+	Echovirus type 20	+
Echovirus type 25	+	Echovirus type 30	+		
Enterovirus C					
Poliovirus type 1	+	Poliovirus type 2	+	Poliovirus type 3	+
Enterovirus D					
Enterovirus type 68*	+				

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-05-21	Vorversion
2021-01-29	Generelle Überarbeitung 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

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

Testspezifische Symbole

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Literatur

1. Piqueur M *et al.* Improvement of a real-time PCR assay for the detection of enterovirus RNA. *Virology Journal* 2009, 6: 95-97.
2. ICTV Master Species List 2018 - (10th Report) - Master Species Lists - Master Species Lists - ICTV Collaboration". <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/8266ictvonline.org>. (aufgerufen am 22.05.2019)
3. The Pirbright Institute, UK, The Picornavirus Pages (aufgerufen am 22.05.2019)
4. De Crom *et al.* Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *Eur J Pediatr* 2016, 175 (8):1023-9.
5. Diop O *et al.* Virologic Monitoring of Poliovirus Type 2 after Oral Poliovirus Vaccine Type 2 Withdrawal in April 2016 — Worldwide, 2016–2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2016. 66, 20. Centers for Disease Control and Prevention.
6. Center for Disease Control and Prevention: Non-Polio Enterovirus infection – Outbreaks & Surveillance.
7. Kiehl H. Infektionen durch Enteroviren. RobertKoch Institut, Kompendium Infektiologie & Infektionsschutz. H. Hoffmann GmbH Verlag 2009.
8. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 7. Oktober 2013. Häufungen von Echovirus-30-bedingten Meningitiden 2013.
9. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 20. Mai 2008. Enterovirus-71-Infektionen: Zum Auftreten der Hand-Fuß-Mund-Krankheit in Südostasien. 2008.

RIDA® GENE Enterovirus

REF PG4705

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. RIDA® GENE Enterovirus is a multiplex real-time RT-PCR for the direct, qualitative detection of enterovirus from human stool samples and cerebrospinal fluid (CSF).¹

RIDA® GENE Enterovirus real-time RT-PCR is intended for use as an aid in diagnosis of infections caused by enteroviruses (poliovirus, echovirus, coxsackievirus, human enterovirus 70/71).

2. Summary and explanation of the test

Enteroviruses belong to the family of *Picornaviridae* and according to the current classification enteroviruses are divided into 15 species (enterovirus A-L and rhinovirus A-C), whereby the species enterovirus E-L are not described as human pathogenic.^{2,3,4} The species enterovirus A includes the human enteroviruses A and the coxsackie viruses A, whereas the enteroviruses B include the human enteroviruses B, the coxsackie viruses B and also the echoviruses. Furthermore, the human enteroviruses C, the coxsackie viruses C and the polioviruses are part of the species enterovirus C.^{2,3,4} Enteroviruses mainly infect infants and small children and are transmitted via the fecal-oral route but also sometimes by droplet infection and contaminated water. Most enterovirus infections are asymptomatic or present with mild cold-like symptoms. Though, due to the multitude of enterovirus species the clinical presentation in severe symptomatic diseases is of broad variety. Severe enterovirus infections are poliomyelitis, hand-foot-and-mouth disease, meningitis and myocarditis.⁴

Polioviruses are single-stranded RNA (ss-RNA) viruses and before their partial eradication they were distributed worldwide. Besides mild symptoms such as fever and cough, poliovirus can also cause poliomyelitis. Although, single outbreaks of poliomyelitis are reported consistently, the number of cases is declining worldwide. Thus, only 37 infections with poliovirus type 1 and no infections with poliovirus type 3 were reported in 2016. Poliovirus type 2 is regarded as eradicated since September 2015.⁵

In 1984, coxsackie virus A and B were first reported and named after their place of detection in Coxsackie, New York. Coxsackie viruses are present worldwide and both strains can cause the so called “summer diarrhea”. In the US, the hand-foot-and-

mouth disease is mostly caused by coxsackie virus A16 whereas other severe coxsackie infections lead to conjunctivitis and myocarditis. Besides coxsackie virus, also an infection with human enterovirus 70 can lead to an acute conjunctivitis.^{6,7} Human enterovirus 71 causes hand-foot-and-mouth disease, however infections with human enterovirus 71 are asymptomatic in most cases. This single-stranded RNA (ss-RNA) virus is distributed worldwide and most often occurs in late summer and fall.^{4,9}

Echovirus is highly infectious and occurs mostly in children. Echovirus can, besides others, lead to aseptic meningitis whereby echovirus 30 is the most common meningitis causing serotype in Europe, America and Asia.⁸

3. Test principle

The RIDA[®]GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR is a molecular diagnostic test for the direct, qualitative detection of Enterovirus RNA from human stool samples and CSF.

The detection is done in a one-step real-time RT-PCR format where the reverse transcription is followed by the PCR in the same reaction tube. The isolated RNA is transcribed into cDNA by a reverse transcriptase. Gene fragments specific for Enterovirus (5'-UTR, if present) are subsequently amplified by real-time PCR. The amplified targets are detected with hydrolysis probes, which are labeled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the presence of a target the probes hybridize to the amplicons. During the extension step the **Taq-Polymerase** breaks the reporter-quencher proximity. The reporter emits a fluorescent signal which is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescence signal increases with the amount of formed amplicons. The RIDA[®]GENE Enterovirus assay contains an **Internal Control RNA** (ICR) as an internal control of sample preparation procedure and/or to determine possible PCR-inhibition.

4. Reagents provided

Tab. 1: Reagents provided (Reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations)

Kit Code	Reagent	Amount		Lid Color
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	yellow
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	red
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	brown
N	No Template Control	1x	450 µl	white
P	Positive Control	1x	200 µl	blue

5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used until the expiration date. After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Reagents can sustain up to 20 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance (e.g. after the first thawing separate it in aliquots and freeze immediately).
- During PCR preparation all the reagents should be stored cold in an appropriate way (2 - 8 °C).

6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:

Tab. 2: Necessary equipment

Extraction platform	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR instruments	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, LightCycler® 480z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Note: Only use 0.1 ml tubes on the Rotor-Gene Q (QIAGEN).

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments please contact R-Biopharm at mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) for use with the LightCycler® 2.0
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) for use with the LightCycler® 480II or LightCycler® 480z
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)
- Centrifuge with a rotor for the reaction vials
- Vortexer
- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves
- PCR water (nuclease-free)

7. Precautions for users

For *in-vitro* diagnostic use.

- This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed.
- The instruction manual for the test procedure has to be followed.
- Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes.
- During handling reagents or samples, wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.
- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.
- All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

For more details see Safety Data Sheets (SDS) at www.r-biopharm.com.

8. Collection and storage of samples

8.1 Sample preparation from stool samples

For RNA isolation of human stool samples, use a commercially available RNA extraction kit (e.g. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) or RNA extraction system (e.g. Maxwell® RSC (Promega)). Extract viral RNA according to the manufacturer's instructions.

We recommend to dilute the stool sample before extraction 1:10 with water. Vortex intensely and centrifuge at 13,000 x g for 1 min. Use from the supernatant an appropriate volume according to the manufacturer's instruction.

The RIDA®GENE Enterovirus assay contains an **Internal Control RNA** that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The **Internal Control RNA** can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the **Internal Control RNA** is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the **Internal Control RNA** should be added to the Master- Mix (s. Tab. 4).

If the **Internal Control RNA** is used as a extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the **Internal Control RNA** has to be added during extraction procedure. The **Internal Control RNA** should always be

added to the specimen-lysis buffer mixture and must **not** be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the negative control and positive control PCR Mix.

8.2 Sample preparation from CSF

For RNA isolation of CSF samples, use a commercially available RNA extraction kit (e.g. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) or RNA extraction system (e.g. Maxwell® RSC (Promega)). Extract viral RNA according to the manufacturer's instructions.

The RIDA®GENE Enterovirus assay contains an **Internal Control RNA** that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The **Internal Control RNA** can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the **Internal Control RNA** is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the **Internal Control RNA** should be added to the Master- Mix (s. Tab. 4).

If the **Internal Control RNA** is used as a extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the **Internal Control RNA** has to be added during extraction procedure. The **Internal Control RNA** should always be added to the specimen-lysis buffer mixture and must **not** be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the negative control and Positive Control PCR Mix.

9. Test procedure

9.1 Master-Mix preparation

Calculate the total number of PCR reactions (sample and control reactions) needed. One Positive Control and one negative control must be included in each assay run.

We recommend to calculate an additional volume of 10 % to compensate imprecise pipetting (see Tab. 3, Tab. 4). Thaw, mix gently and centrifuge briefly the **Reaction Mix**, the **Enzyme Mix**, the **Positive Control**, the **No Template Control** and the **Internal Control RNA** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 - 8 °C).

Tab. 3: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master Mix (ICR as extraction and PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

Tab. 4: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master Mix (ICR only as PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
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
	Total	21.0 µl	231.0 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

9.2 Preparation of the RT-PCR-Mix

Pipette 20 µl of the Master-Mix in each reaction vial (tube or plate).

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

Note: If the **Internal Control RNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR-Mix of the negative control.

Samples: Add 5 µl eluate to the pre-pipetted Master-Mix.

Positive Control: Add 5 µl **Positive Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control RNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR Mix of the Positive Control.

Cover tubes or plate. Spin down and place in the real-time PCR instrument. The RT-PCR reaction should be started according to the PCR instrument set-up (see Tab. 5, Tab. 6).

9.3 PCR instrument set-up

9.3.1 Universal real-time RT-PCR profile

Tab. 5: Universal real-time RT-PCR profile for LightCycler® series

<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 occur in the same step.

Tab. 6: Universal real-time RT-PCR profile for Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q and CFX96™

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and extension occur in the same step.

Note: The universal real-time PCR profile can also be used for DNA assays if **RIDA®GENE DNA** and **RIDA®GENE RNA** real-time PCR assays are combined in one run.

9.4 Detection channel set-up

Tab. 7: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR instrument	Detection	Detection channel	Note
Roche LightCycler® 2.0	Enterovirus	530	RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) is required
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Enterovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480z	Enterovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICR	540/580	
Agilent Techn. Mx3005P	Enterovirus	FAM	Check that reference dye is none
	ICR	HEX	
ABI 7500	Enterovirus	FAM	Check that passive reference option ROX is none
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Enterovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Enterovirus	Green	The gain settings have to be set to 5, according to the default settings
	ICR	Yellow	

10. Quality control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions. Positive Control and negative control have to show correct results (see Table 8, Fig. 1) in order to determine a valid run.

The **Positive Control** has a concentration of 10^3 copies/ μ l. In each PCR run it is used in a total amount of 5×10^3 copies.

Tab. 8: For a valid run, the following conditions must be met:

Sample	Assay result	ICR Ct	Target Ct
Positive Control	Positive	NA *1	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	0

**1 No Ct value is required for the ICR to make a positive call for the Positive Control.*

If the positive control is not positive within the specified Ct range but the negative control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the negative control is not negative but the positive control is valid prepare all new reactions including the controls.

If the required criteria are not met, following items have to be checked before repeating the test:

- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure

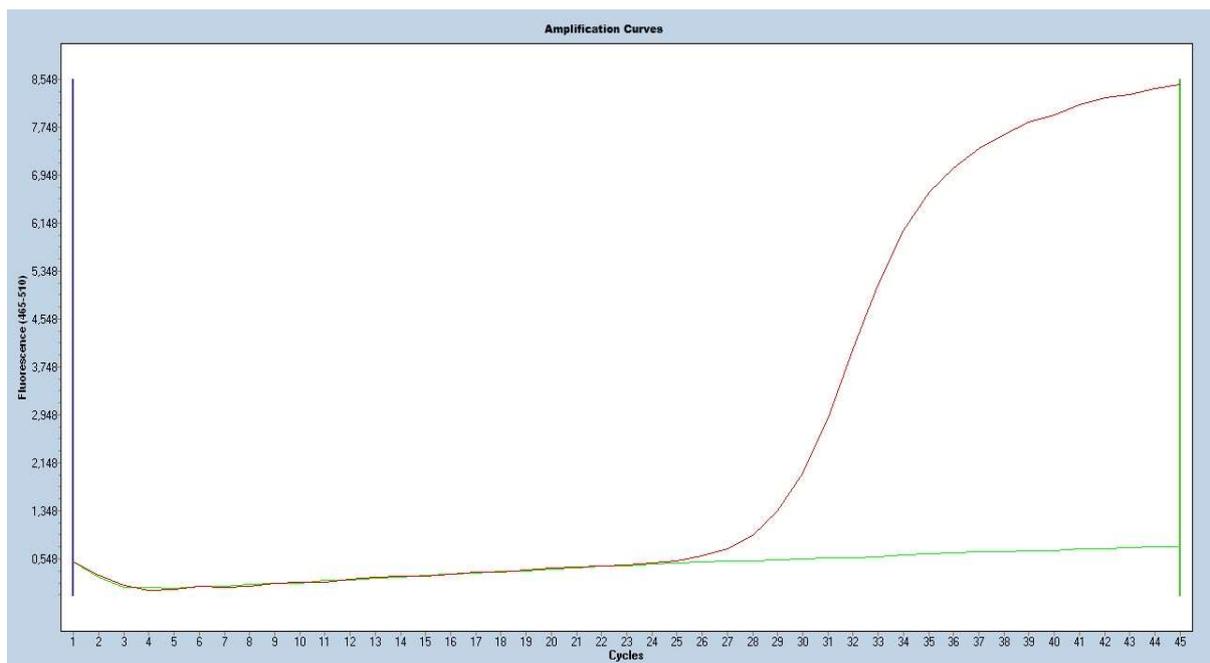


Fig. 1: Correct run of the positive control and negative control (Enterovirus) on the LightCycler® 480II

11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Table 9.

Tab. 9: Sample interpretation

Target gene		
Enterovirus	ICR	Result
positive	positive/negative	Enterovirus detected
negative	positive	Target genes not detected
negative	negative	Invalid

Enterovirus is detected, if the sample RNA and the Internal Control RNA show an amplification signal in the detection system.

Enterovirus is also detected, if the sample RNA shows an amplification signal but none for the Internal Control RNA in the detection system. The detection of the Internal Control RNA is not necessary because high concentrations of the amplicon can cause a weak or absent signal of the Internal Control RNA.

Enterovirus is not detected, if the sample RNA shows no amplification signal, but an amplification signal for the Internal Control RNA in the detection system. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the detection of the Internal Control RNA.

A sample is invalid, if the sample RNA and Internal Control RNA show no amplification signal in the detection system. The sample contains a PCR inhibitor. The extracted sample needs to be further diluted with PCR water (1:10) and re-amplified, or the isolation and purification of the sample has to be improved.

12. Limitations of the method

1. The result of molecular analysis should not lead to the diagnosis, but always be considered in the context of medical history and symptoms of the patient.
2. This assay is only suitable for human stool samples and CSF samples.
3. Inappropriate specimen collection, transport, storage and processing or a pathogen load in the specimen below the analytical sensitivity can result in false negative results.
4. The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
5. Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new variants resulting in a false negative result with the RIDA[®]GENE Enterovirus assay.
6. As with all PCR based *in vitro* diagnostic tests, extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result is indicative for the presence of the target gene (5'-UTR).
8. Rhinoviruses belong to the family of *Picornaviridae*. Due to sequence similarity, it cannot be ruled out, that the RIDA[®]GENE Enterovirus assay shows cross reactivity to rhinoviruses.

13. Performance characteristics

13.1 Clinical performance

In a retrospective clinical validation study we analyzed 124 extracted human stool specimens with the RIDA®GENE Enterovirus assay and an in-house real-time PCR assay in an institute in Germany.

Tab.10: Correlation of the Enterovirus results with the RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR and reference in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			
		Positive	Negative	Total	
RIDA®GENE Enterovirus	Positive	40	0	40	PPV: 100.0 %
	Negative	1	83	84	NPV: 98.8 %
	Total	41	83	124	

13.2 Analytical sensitivity

The RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR has a detection limit of ≥ 50 RNA copies per reaction for enterovirus.

The following figure 2 shows a dilution series of Enterovirus (10^5 – 10^1 RNA copies per μl) on the LightCycler® 480II.

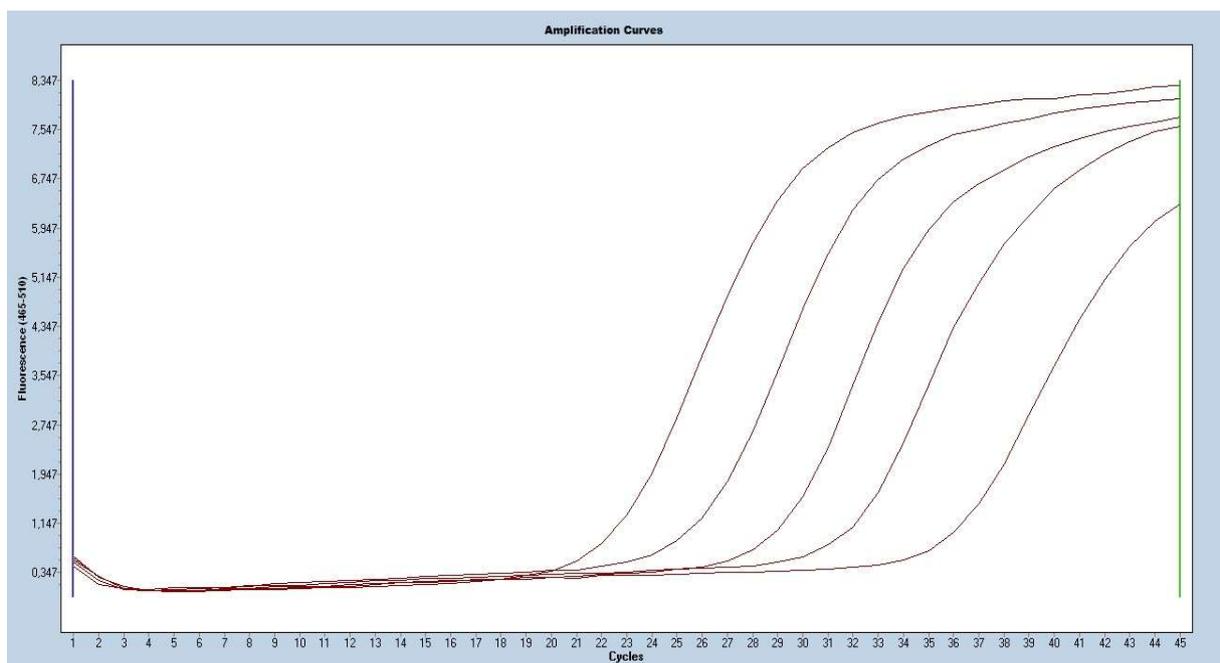


Fig. 2: Dilution series Enterovirus (10^5 – 10^1 RNA copies per μl) on the LightCycler® 480II

The detection limit of the whole procedure depends on the sample matrix, RNA extraction and RNA concentration.

13.3 Analytical specificity

The analytical specificity of the RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR is specific for Enterovirus from human stool samples. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab. 11):

Tab. 11: Cross-reactivity testing

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	Respiratory syncytial virus, human, strain Long	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	Respiratory syncytial virus, human, strain 9320	-
Adenovirus 41, Human, Strain Tak	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	Rhinovirus, human, Genogruppe A	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	Influenza virus A/PR/8/34	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Astrovirus	-	Coronavirus 229E, human	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Metapneumovirus, human	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Cytomegalovirus, human	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Norovirus GG I	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Norovirus GG II	-	<i>Staphylococcus hominis</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	Parainfluenza virus 1, human, strain C35	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Parainfluenza virus 2, human, strain Greer	-	Varicella Zoster Virus (Type B)	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Parainfluenza virus, serotype 3	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-

<i>Candida albicans</i>	-	Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	Parainfluenza virus 4b, human, strain CH19503	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-				

13.4 Analytical reactivity

The reactivity of the RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR was evaluated against multiple strains of Enterovirus (see Tab. 12). All strains of the panel were detected by the RIDA®GENE Enterovirus multiplex real-time RT-PCR or by sequence alignment (*).

Tab. 12: Analytical reactivity testing

Enterovirus					
Enterovirus A					
Enterovirus type 71	+	Coxsackievirus A9	+		
Enterovirus B					
Coxsackievirus B1	+	Coxsackievirus B2	+	Coxsackievirus B3	+
Coxsackievirus B4	+	Coxsackievirus B5	+	Echovirus type 6	+
Echovirus type 7	+	Echovirus type 11	+	Echovirus type 20	+
Echovirus type 25	+	Echovirus type 30	+		
Enterovirus C					
Poliovirus type 1	+	Poliovirus type 2	+	Poliovirus type 3	+
Enterovirus D					
Enterovirus type 68*	+				

14. Version history

Version number	Chapter and designation
2019-05-21	Previous version
2021-01-29	General revision 10. Quality control (Spelling mistake) 14. Version history 15. Explanation of symbols

15. Explanation of symbols

General symbols

	For <i>in vitro</i> diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

Testspecific symbols

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Literature

1. Piqueur M *et al.* Improvement of a real-time PCR assay for the detection of enterovirus RNA. *Virology Journal* 2009, 6: 95-97.
2. ICTV Master Species List 2018 - (10th Report) - Master Species Lists - Master Species Lists - ICTV Collaboration". <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/8266ictvonline.org>. (accessed 22.05.2019)
3. The Pirbright Institute, UK, The Picornavirus Pages (accessed 22.05.2019)
4. De Crom *et al.* Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *Eur J Pediatr* 2016, 175 (8):1023-9.
5. Diop O *et al.* Virologic Monitoring of Poliovirus Type 2 after Oral Poliovirus Vaccine Type 2 Withdrawal in April 2016 — Worldwide, 2016–2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2016. 66, 20. Centers for Disease Control and Prevention.
6. Center for Disease Control and Prevention: Non-Polio Enterovirus infection – Outbreaks & Surveillance.
7. Kiehl H. Infektionen durch Enteroviren. RobertKoch Institut, Kompendium Infektiologie & Infektionsschutz. H. Hoffmann GmbH Verlag 2009.
8. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 7. Oktober 2013. Häufungen von Echovirus-30-bedingten Meningitiden 2013.
9. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 20. Mai 2008. Enterovirus-71-Infektionen: Zum Auftreten der Hand-Fuß-Mund-Krankheit in Südostasien. 2008.

RIDA® GENE Enterovirus

REF PG4705

1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA® GENE Enterovirus es un ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de enterovirus en muestras humanas de heces y líquido cefalorraquídeo (LCR).¹

El ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA® GENE Enterovirus está concebido para usarse como una ayuda en el diagnóstico de infecciones causadas por enterovirus (virus de la polio, ecovirus, coxsackievirus, enterovirus humanos 70/71).

2. Resumen y descripción del ensayo

Los enterovirus pertenecen a la familia *Picornaviridae* y de acuerdo con la clasificación actual, los enterovirus se dividen en 15 especies (enterovirus A-L y rinovirus A-C); de estas, las especies de enterovirus E-L no se han descrito como patógenos humanos.^{2,3,4} La especie de enterovirus A incluye a los enterovirus humanos A y el coxsackievirus A, mientras que los enterovirus B incluyen a los enterovirus humanos B, los coxsackievirus B y también a los ecovirus. Además, los enterovirus humanos C, los coxsackievirus C y los virus de la polio forman parte de la especie enterovirus C.^{2,3,4} Los enterovirus infectan principalmente a los lactantes y niños pequeños, y se transmiten por vía fecal-oral, aunque en ocasiones también por infección por pequeñas gotas y agua contaminada. La mayoría de las infecciones por enterovirus son asintomáticas o se asocian a síntomas similares a los de un resfriado leve. No obstante, debido a la multitud de especies de enterovirus, la presentación clínica en enfermedades sintomáticas graves es muy amplia. Las infecciones graves por enterovirus son la poliomielitis, el exantema viral de manos, pies y boca, la meningitis y la miocarditis.⁴

Los virus de la polio son virus de ARN monocatenario (ARNmc) y antes de su erradicación parcial, se distribuían por todo el mundo. Además de síntomas leves como fiebre y tos, el virus de la polio también puede causar poliomielitis. Aunque todo el tiempo se comunican brotes aislados de poliomielitis, el número de casos está disminuyendo en todo el mundo. Así, en 2016 se reportaron únicamente 37 infecciones con el virus de la polio tipo 1 y ninguna con el virus de la polio tipo 3. El virus de la polio tipo 2 se considera erradicado desde septiembre de 2015.⁵

Los coxsackievirus A y B se reportaron por primera vez en 1984 y se designaron por su lugar de detección, en Coxsackie, Nueva York. Los coxsackievirus están presentes en todo el mundo y ambas cepas pueden causar la llamada "diarrea estival". En Estados Unidos, el exantema viral de manos, pies y boca es causado principalmente por el coxsackievirus A16, mientras que otras infecciones graves por estos virus producen conjuntivitis y miocarditis. Además de los coxsackievirus, la infección por enterovirus humano 70 también puede causar conjuntivitis aguda.^{6,7} El enterovirus humano 71 causa exantema viral de manos, pies y boca, pero las infecciones con este virus son asintomáticas en la mayoría de los casos. Este virus de ARN monocatenario (ARNmc) se distribuye por todo el mundo y se observa con más frecuencia a finales de verano y en otoño.^{4,9}

El ecovirus es muy infeccioso y se observa principalmente en los niños. Entre otros, el ecovirus puede producir meningitis aséptica y el ecovirus 30 es el serotipo que causa meningitis con mayor frecuencia en Europa, América y Asia.⁸

3. Principio del ensayo

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Enterovirus es una prueba de diagnóstico molecular para la detección cualitativa directa de ARN de enterovirus en muestras humanas de heces y LCR.

La detección se lleva a cabo en un formato de RT-PCR en tiempo real en un paso, donde la transcripción inversa va seguida de la PCR en el mismo tubo de reacción. El ARN aislado se transcribe en ADNc por la acción de la transcriptasa inversa. Posteriormente, los fragmentos génicos específicos de enterovirus (5'-UTR, si está presente) se amplifican por PCR en tiempo real. Las dianas amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-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 en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA®GENE Enterovirus contiene un **Internal Control RNA** (ICR) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra y para determinar la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rojo
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	café
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos de la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a entre 2 °C y 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente dividir en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de manera adecuada (2 °C a 8 °C).

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Enterovirus es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción e instrumentos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipo necesario

Plataforma de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Equipos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, LightCycler® 480z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para uso con el LightCycler® 2.0
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II o el LightCycler® 480z
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua sin nucleasas)

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

- Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.
- Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba.
- No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas.
- Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba.
- No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.
- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.
- Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de las muestras a partir de muestras de heces

Para el aislamiento del ARN a partir de muestras de heces humanas, use un kit de extracción de ARN (p. ej. RIDA® Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ARN (p. ej., Maxwell® RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ARN viral siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se recomienda diluir las muestras de heces 1:10 con agua antes de la extracción. Mezcle la muestra en un agitador de vórtex a alta velocidad y centrifúguela a 13 000 x g durante 1 min. Use el volumen de sobrenadante adecuado, según las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA®GENE Enterovirus contiene un **Internal Control RNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control RNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control RNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control RNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 20 µl de **Internal Control RNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control RNA** debe agregarse siempre a la mezcla de la solución amortiguadora de lisado de muestras, y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

8.2 Preparación de las muestras a partir de LCR

Para aislar el ARN de las muestras de LCR, use un kit comercial de extracción de ARN (p. ej., RIDA® Xtract (R-Biopharm)) o un sistema de extracción de ARN (p. ej., Maxwell® RSC (Promega)). Extraiga el ARN viral siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA®GENE Enterovirus contiene un **Internal Control RNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control RNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control RNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control RNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 20 µl de **Internal Control RNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control RNA** debe agregarse siempre a la mezcla de la solución amortiguadora de lisado de muestras, y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3, 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Enzyme Mix**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control RNA** antes de usarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C a 8 °C) durante la etapa de trabajo.

Tabla 3: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICR como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

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

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
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
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla para RT-PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

Control negativo: Agregue 5 µl de **No Template Control** la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para RT-PCR del control negativo.

Muestras: Agregue 5 µl de eluato a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Agregue 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para RT-PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de RT-PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil universal de RT-PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil universal de RT-PCR en tiempo real en el equipo serie LightCycler®

<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	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil universal de RT-PCR en tiempo real de Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q y CFX96™

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura /Velocidad de rampa	Máxima

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

Nota: El perfil universal de la PCR en tiempo real también puede usarse en los ensayos de ADN si se combinan en una corrida los ensayos de PCR en tiempo real de ADN RIDA®GENE y de ARN RIDA®GENE.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 7: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 2.0	Enterovirus	530	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002).
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Enterovirus	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480z	Enterovirus	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	540/580	
Agilent Techn. Mx3005P	Enterovirus	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICR	HEX	
ABI 7500	Enterovirus	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Enterovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Enterovirus	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.
	ICR	Amarillo	

10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 8, figura 1) para determinar que un ensayo es válido.

El **Positive Control** tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de 5×10^3 copias.

Tabla 8: Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICR	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	ND *1	Consulte el certificado de garantía de calidad.
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

**1 No se requiere un valor de Ct del ICR para determinar que el control positivo es positivo.*

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

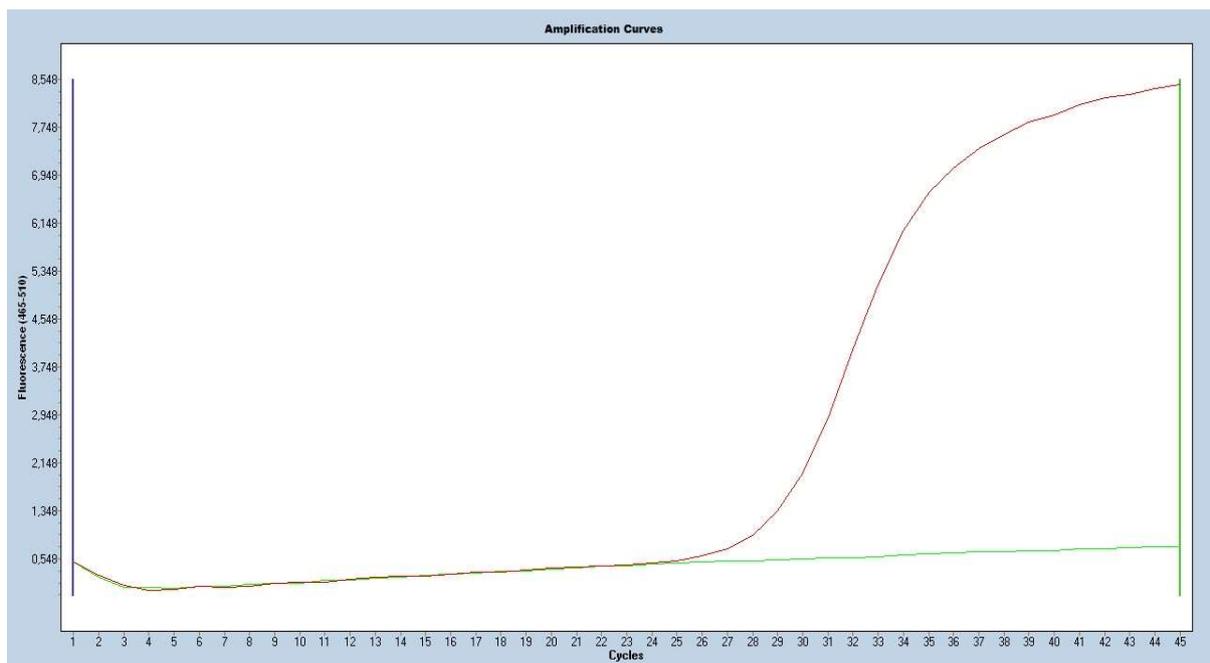


Figura 1: Procesamiento correcto del control positivo y el control negativo (Enterovirus) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 9.

Tabla 9: Interpretación de las muestras

Gen diana		
Enterovirus	ICR	Resultado
positivo	positivo/negativo	Enterovirus detectado
negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	No válido

Se detecta enterovirus si el ARN de la muestra y el **Internal Control RNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

También se detecta enterovirus si el ARN de la muestra, pero no el **Internal Control RNA**, presenta una señal de amplificación en el sistema de detección. La detección del **Internal Control RNA** no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control RNA** sea débil o esté ausente.

No se detecta enterovirus si el ARN de la muestra no presenta señal de amplificación en el sistema de detección, aunque el **Internal Control RNA** sí muestre señal de amplificación. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del **Internal Control RNA**.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ARN de la muestra y del **Internal Control RNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo es adecuado para muestras humanas de heces y LCR.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de nuevas variantes y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA[®]GENE Enterovirus.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia del gen diana (5'-UTR).
8. Los rinovirus pertenecen a la familia *Picornaviridae*. Debido a la similitud de las secuencias, no se puede descartar que el ensayo RIDA[®]GENE Enterovirus muestre reactividad cruzada con los rinovirus.

13. Características de rendimiento

13.1 Rendimiento clínico

En un estudio retrospectivo de validación clínica se analizaron 124 muestras de heces humanas extraídas con el ensayo RIDA®GENE Enterovirus y con un ensayo interno de PCR en tiempo real en un centro de Alemania.

Tabla 10: Correlación de los resultados de enterovirus con el ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Enterovirus y el ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia.

		Ensayo de PCR en tiempo real interno			
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE Enterovirus	Positivo	40	0	40	PPV: 100,0 %
	Negativo	1	83	84	NPV: 98,8 %
	Total	41	83	124	

13.2 Sensibilidad analítica

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Enterovirus tiene un límite de detección de ≥ 50 copias de ARN por reacción para enterovirus.

En la figura 2, a continuación, se muestran diluciones seriadas de enterovirus (10^5 - 10^1 copias de ARN por μl) en el LightCycler® 480II.

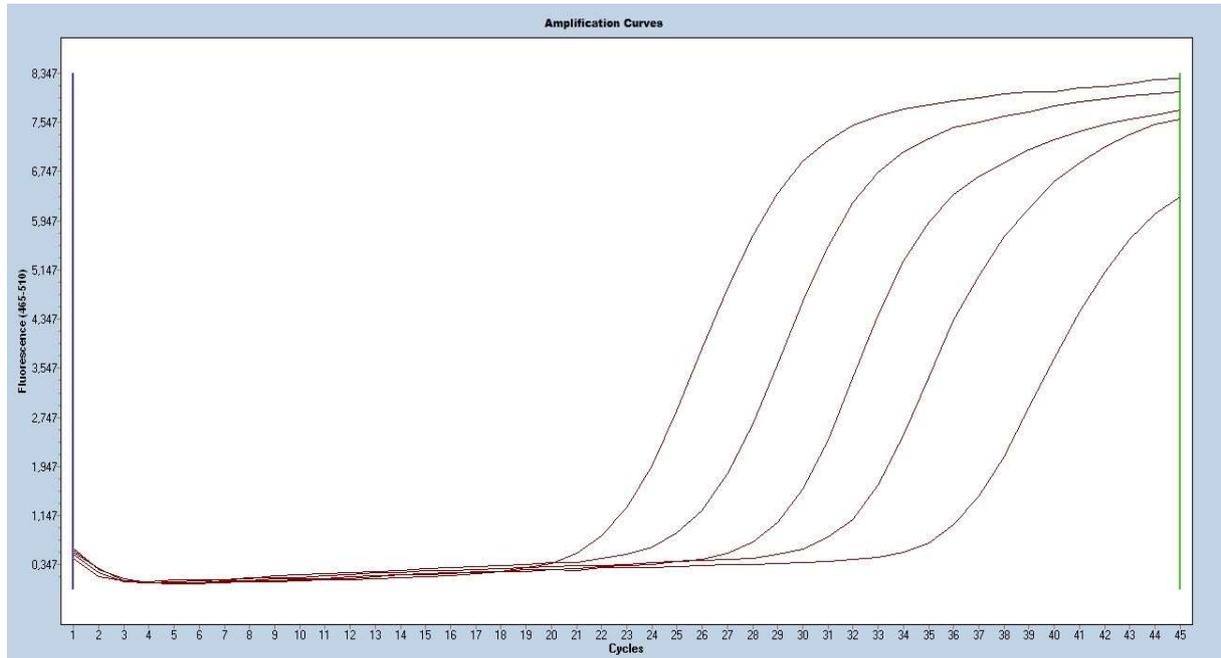


Figura 2: Diluciones seriadas de enterovirus (10^5 - 10^1 copias de ARN por μl) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ARN y la concentración del ARN.

13.3 Especificidad analítica

La especificidad analítica del ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Enterovirus es específica para los enterovirus en las muestras de heces humanas. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 11):

Tabla 11: Ensayos de reactividad cruzada

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Adenovirus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i>	-
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Metaneumovirus, humano	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus de la gripe A/PR/8/34	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Virus de la varicela-zóster (tipo B)	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	Coronavirus 229E, humano	-	Norovirus GG I	-	Virus del herpes simple 1, cepa McIntyre	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG II	-	Virus del herpes simple 2, cepa MS	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	Virus Epstein-Barr, cepa B95-8	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Virus paragripal 1, humano, cepa C35	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Rinovirus, humano, genogrupo A	-	Virus paragripal 2, humano, cepa Greer	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavirus	-	Virus paragripal 4b, humano, cepa CH19503	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	Virus paragripal, serotipo 3	-
<i>Campylobacter lari</i> subespecie <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Virus sincial respiratorio, humano, cepa 9320	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	Virus sincial respiratorio, humano, cepa Long	-

<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
Citomegalovirus, humano	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB clon C6	-				

13.4 Sensibilidad analítica

La reactividad del ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Enterovirus se evaluó en comparación con varias cepas de enterovirus (consulte la tabla 12). Todas las cepas del panel se detectaron con el ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Enterovirus o por alineación de secuencias (*).

Tabla 12: Pruebas de reactividad analítica

Enterovirus					
Enterovirus A					
Enterovirus tipo 71	+	Coxsackievirus A9	+		
Enterovirus B					
Coxsackievirus B1	+	Coxsackievirus B2	+	Coxsackievirus B3	+
Coxsackievirus B4	+	Coxsackievirus B5	+	Ecovirus tipo 6	+
Ecovirus tipo 7	+	Ecovirus tipo 11	+	Ecovirus tipo 20	+
Ecovirus tipo 25	+	Ecovirus tipo 30	+		
Enterovirus C					
Virus de la polio tipo 1	+	Virus de la polio tipo 2	+	Virus de la polio tipo 3	+
Enterovirus D					
Enterovirus tipo 68*	+				

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2019-05-21	Versión anterior
2021-01-29	Revisión general 10. Control de calidad (Error ortográfico) 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliografía

1. Piqueur M *et al.* Improvement of a real-time PCR assay for the detection of enterovirus RNA. *Virology Journal* 2009, 6: 95-97.
2. ICTV Master Species List 2018 - (10th Report) - Master Species Lists - Master Species Lists - ICTV Collaboration". <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/8266ictvonline.org>. (accessed 22.05.2019)
3. The Pirbright Institute, UK, The Picornavirus Pages (accessed 22.05.2019)
4. De Crom *et al.* Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *Eur J Pediatr* 2016, 175 (8):1023-9.
5. Diop O *et al.* Virologic Monitoring of Poliovirus Type 2 after Oral Poliovirus Vaccine Type 2 Withdrawal in April 2016 — Worldwide, 2016–2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2016. 66, 20. Centers for Disease Control and Prevention.
6. Center for Disease Control and Prevention: Non-Polio Enterovirus infection – Outbreaks & Surveillance.
7. Kiehl H. Infektionen durch Enteroviren. RobertKoch Institut, Kompendium Infektiologie & Infektionsschutz. H. Hoffmann GmbH Verlag 2009.
8. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 7. Oktober 2013. Häufungen von Echovirus-30-bedingten Meningitiden 2013.
9. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 20. Mai 2008. Enterovirus-71-Infektionen: Zum Auftreten der Hand-Fuß-Mund-Krankheit in Südostasien. 2008.

RIDA® GENE Enterovirus

REF PG4705

1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA® GENE Enterovirus est un test de RT-PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de l'entérovirus dans des échantillons de selles humaines et de liquide céphalo-rachidien (LCR)¹.

Le test de RT-PCR en temps réel RIDA® GENE Enterovirus est destiné à faciliter le diagnostic des infections provoquées par des entérovirus (poliovirus, échovirus, coxsackievirus, entérovirus humain 70/71).

2. Résumé et explication du test

Les entérovirus appartiennent à la famille des *Picornaviridae* et, selon la classification en vigueur, les entérovirus englobent 15 espèces (entérovirus A-L et rhinovirus A-C), d'après laquelle les espèces d'entérovirus E-L sont décrites comme n'étant pas pathogènes pour l'être humain^{2,3,4}. L'espèce d'entérovirus A englobe les entérovirus humains A et les coxsackievirus A, et l'espèce d'entérovirus B englobe les entérovirus humains B, les coxsackievirus B et aussi les échovirus. De plus, les entérovirus humains C, les coxsackievirus C et les poliovirus appartiennent à l'espèce entérovirus C^{2,3,4}. Les entérovirus infectent principalement les nourrissons et les jeunes enfants et sont transmis par voie oro-fécale, mais parfois par des gouttelettes et de l'eau contaminée. La plupart des infections par entérovirus sont asymptomatiques ou présentent des symptômes légers de type rhume. Néanmoins, en raison de la grande diversité des espèces d'entérovirus, le tableau clinique est très diversifié lorsque la maladie est grave et symptomatique. Les infections graves par entérovirus comprennent la poliomyélite, le syndrome pieds-mains-bouche, la méningite et la myocardite⁴.

Les poliovirus sont des virus à ARN simple brin (ARNsb) et étaient présents dans le monde entier avant leur éradication partielle. Mis à part les symptômes légers comme la fièvre et la toux, les poliovirus peuvent aussi provoquer la poliomyélite. Même si des épidémies de poliomyélite localisées sont souvent signalées, le nombre de cas est en diminution à l'échelle globale. Ainsi, seulement 37 infections par le virus de la poliomyélite de type 1 ont été signalées en 2016, mais pas d'infection par le virus de la poliomyélite de type 3. Le poliovirus de type 2 est considéré comme étant éradiqué depuis septembre 2015⁵.

En 1984, les coxsackievirus A et C ont été signalés pour la première fois et nommés selon le lieu de détection, à savoir Coxsackie, New York. Les coxsackievirus sont présents dans le monde entier et les deux souches provoquent la diarrhée dite « estivale ». Aux États-Unis, le syndrome pieds-mains-bouche est principalement provoqué par le coxsackievirus A16, et d'autres infections graves par le coxsackievirus provoquent une conjonctivite et une myocardite. Outre le coxsackievirus, une infection par l'entérovirus humain 70 peut entraîner une conjonctivite aiguë^{6,7}.

L'entérovirus humain 71 provoque le syndrome pieds-mains-bouche mais, dans la plupart des cas, les infections par ce virus sont asymptomatiques. Ce virus à ARN simple brin (ARNsb) est réparti dans le monde entier et se manifeste le plus souvent à la fin de l'été et en automne^{4,9}.

L'échovirus est très infectieux et se manifeste principalement chez les enfants. Il peut aussi entraîner une méningite aseptique, l'échovirus 30 étant le sérotype le plus souvent associé à la méningite en Europe, en Amérique et en Asie⁸.

3. Principe du test

Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA[®]GENE Enterovirus est un test de diagnostic moléculaire pour la détection qualitative directe de l'ARN d'entérovirus dans les échantillons de selles humaines et le LCR.

La détection se fait dans un format de RT-PCR en temps réel en une seule étape où la transcription inverse est suivie de la PCR dans le même tube de réaction. L'ARN isolé est transcrit en ADNc par une transcriptase inverse. Les fragments de gènes spécifiques aux entérovirus (5'-UTR, si présents) sont ensuite amplifiés par PCR en temps réel. Les cibles amplifiées sont détectées grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la Taq-Polymerase rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA[®]GENE Enterovirus contient un Internal Control RNA (ICR) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et/ou pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu du paquet

Tableau 1: Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	jaune
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rouge
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	brun
N	No Template Control	1x	450 µl	blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	bleu

5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Enterovirus peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants:

Tableau 2: Matériel nécessaire

Plateforme d'extraction	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Instruments de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, LightCycler® 480z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Remarque: utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler® 2.0
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec les appareils LightCycler® 480II ou LightCycler® 480z
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes à filtre
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (sans nucléase)

7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

- Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.
- Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test.
- Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses.
- Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.
- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.
- Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'échantillon à partir d'échantillons de selles

Pour isoler l'ARN des échantillons de selles humaines, utiliser un kit d'isolation d'ARN (par ex., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ARN (par ex., Maxwell® RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ARN conformément aux instructions du fabricant.

Il convient de diluer l'échantillon de selles avant extraction avec de l'eau selon un rapport de 1/10. Agiter fortement l'échantillon et le centrifuger à 13 000 x g pendant 1 min. Utiliser un volume adéquat de surnageant conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA®GENE Enterovirus inclut un ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si le **Internal Control RNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control RNA** au mélange maître (voir tableau 4).

Si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 20 µl de **Internal Control RNA** pendant la procédure d'extraction. Le **Internal Control RNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl d'ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

8.2 Préparation des échantillons à partir du LCR

Pour isoler l'ARN des échantillons de LCR, utiliser un kit d'isolation d'ARN (par ex., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ARN (par ex., Maxwell® RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ARN conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA®GENE Enterovirus inclut un ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si le **Internal Control RNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control RNA** au mélange maître (voir tableau 4).

Si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 20 µl de **Internal Control RNA** pendant la procédure d'extraction. Le **Internal Control RNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl d'ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10 % pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3, 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le **Reaction Mix**, le **Enzyme Mix**, le **Positive Control**, le **No Template Control** et le **Internal Control RNA** avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 et 8 °C).

Tableau 3: Exemple de calcul et de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICR comme pour l'extraction et contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

Tableau 4: Exemple de calcul et de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICR uniquement comme pour le contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
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
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la RT-PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

Contrôle négatif: Ajouter 5 µl de contrôle sans matrice **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque: si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control RNA** au mélange de contrôle négatif pour la RT-PCR.

Échantillons: Ajouter 5 µl d'éluat au mélange maître pré-pipeté.

Contrôle positif: Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque: si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control RNA** au mélange de contrôle positif pour la RT-PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de RT-PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (voir tableaux 5, 6).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil universel de RT-PCR en temps réel

Tableau 5: Profil universel de RT-PCR en temps réel pour la série LightCycler®

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

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

Tableau 6: Profil universel de RT-PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q et CFX96™

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

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

Remarque: le profil universel de PCR en temps réel peut aussi être utilisé pour les tests d'ADN si les tests de PCR en temps réel RIDA®GENE DNA et RIDA®GENE RNA sont combinés dans un même test.

9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 7: Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 2.0	Entérovirus	530	RIDA®GENE Le kit de compensation de couleur II (PG0002) est nécessaire
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Entérovirus	465/510	RIDA®GENE Le kit de compensation de couleur IV (PG0004) est nécessaire
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480z	Entérovirus	465/510	RIDA®GENE Le kit de compensation de couleur IV (PG0004) est nécessaire
	ICR	540/580	
Agilent Techn. Mx3005P	Entérovirus	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICR	HEX	
ABI 7500	Entérovirus	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Entérovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Entérovirus	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut
	ICR	Jaune	

10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle positif et le contrôle négatif doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 8, figure 1) afin de déterminer qu'une série est valide.

Le **Positive Control** a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 copies de contrôle positif.

Tableau 8: Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites:

Échantillon	Résultat du test	Ct ICR	Ct cible
Contrôle positif	Positif	S/O *1	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	0

*1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICR soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test:

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test

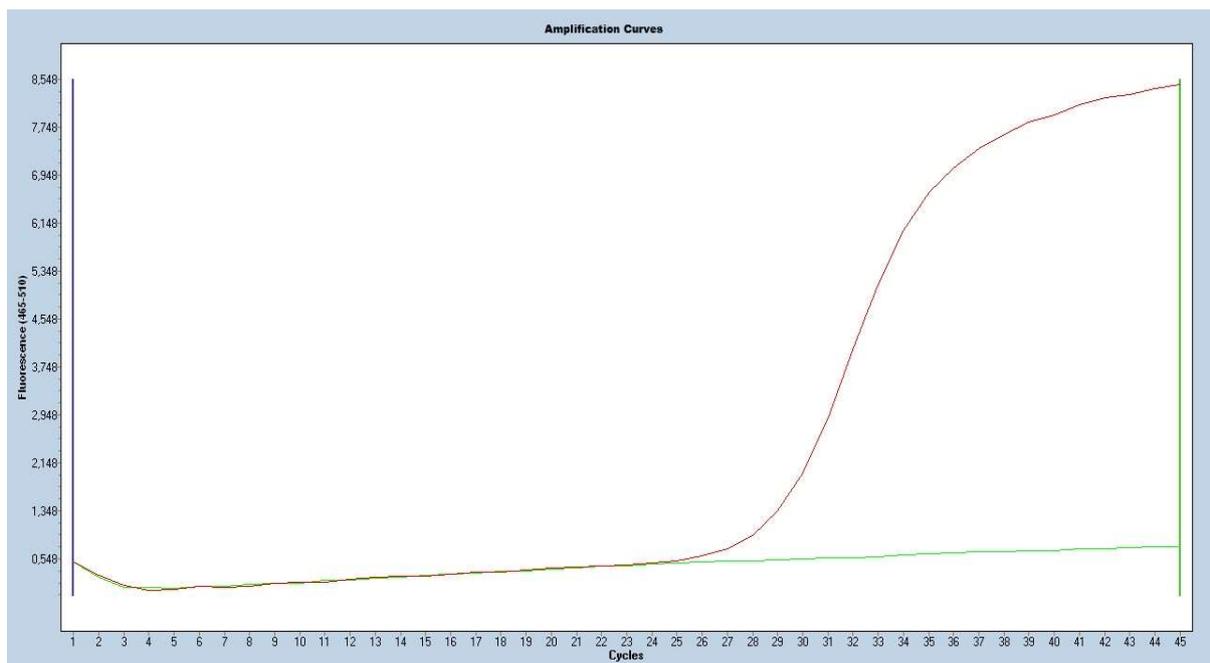


Figure 1: Exécution correcte des contrôles positif et négatif (Entérovirus) sur le LightCycler® 480II

11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 9.

Tableau 9: Interprétation des échantillons

Gène cible		
Entérovirus	ICR	Résultat
positif	positif/négatif	Entérovirus détecté
négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	Non valide

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

L'entérovirus est également détecté 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** n'est pas nécessaire car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent du **Internal Control RNA**.

L'entérovirus n'est pas détecté si l'ARN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour le

Internal Control RNA. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection de l'ARN du contrôle interne **Internal Control RNA**.

Un échantillon est non valide si l'ARN de l'échantillon et l'ARN du contrôle interne **Internal Control RNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR. L'échantillon extrait doit encore être dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est uniquement adapté pour les échantillons de selles et les échantillons de LCR.
3. Les prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects de l'échantillon ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA®GENE Enterovirus.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence du gène cible (5'-UTR).
8. Les rhinovirus appartiennent à la famille des *Picornaviridae*. En raison de la similarité de séquence, il n'est pas possible d'exclure que le test RIDA®GENE Enterovirus présente une réactivité croisée aux rhinovirus.

13. Performances

13.1 Performance clinique

Dans une étude de validation clinique rétrospective, 124 échantillons extraits de selles humaines à l'aide du test RIDA®GENE Enterovirus et d'un test de PCR en temps réel interne ont été analysés par un institut situé en Allemagne.

Tableau 10: Corrélation des résultats de l'entérovirus obtenus avec le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Enterovirus et de la PCR en temps réel interne de référence.

		PCR en temps réel interne			
		Positif	Négatif	Total	
RIDA®GENE Enterovirus	Positif	40	0	40	VPP: 100,0 %
	Négatif	1	83	84	VPN: 98,8 %
	Total	41	83	124	

13.2 Sensibilité analytique

Pour le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Enterovirus, la limite de détection est ≥ 50 copies d'ARN par réaction pour les entérovirus.

La figure 2 ci-dessous présente une série de dilutions d'entérovirus ($10^5 - 10^1$ copies d'ARN par μl) avec le LightCycler® 480II.

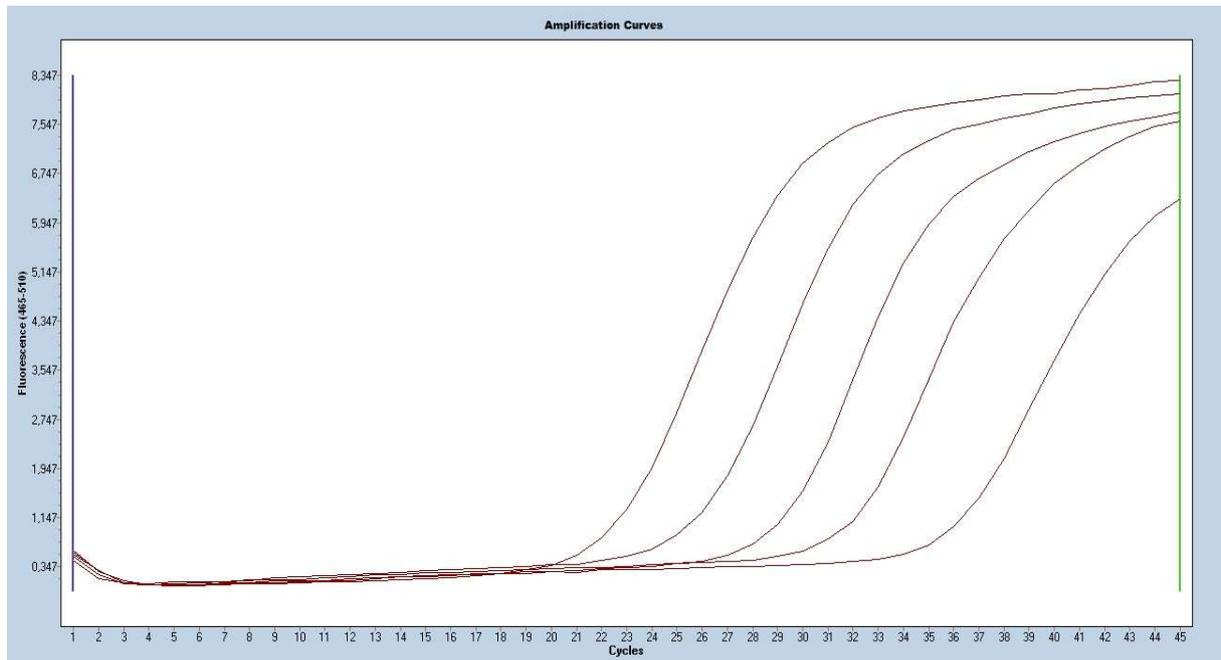


Figure 2: Série de dilutions pour les entérovirus ($10^5 - 10^1$ copies d'ARN par μl) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ARN et de la concentration de l'ARN.

13.3 Spécificité analytique

La spécificité analytique du test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Enterovirus est spécifique pour les entérovirus dans les échantillons de selles humaines. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 11):

Tableau 11: Test de la réactivité croisée

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Adénovirus 40, humain, souche Dugan	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
Adénovirus 41, humain, souche Tak	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i>	-
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	Métapneumovirus, humain	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus d'Epstein-Barr souche B95-8	-
Astrovirus	-	Coronavirus 229E, humain	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Virus de la grippe A/PR/8/34	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG I	-	Virus Herpes simplex 1 souche McIntyre	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GG II	-	Virus Herpes simplex 2 souche MS	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Cytomégalovirus, humain	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	Virus parainfluenza 1, humain, souche C35	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Virus parainfluenza 2, humain, souche Greer	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Rhinovirus, humain, génogroupe A	-	Virus parainfluenza 4b, humain, souche CH19503	-
<i>Campylobacter fetus</i> sous-esp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavirus	-	Virus parainfluenza, sérotype 3	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche 9320	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche Long	-

<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	Virus varicelle-zona (type B)	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-				

13.4 Réactivité analytique

La réactivité du test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Enterovirus a été évaluée par rapport à plusieurs souches d'entérovirus (voir tableau 12). Toutes les souches du panel ont été détectées par le test de RT-PCR en temps réel RIDA®GENE Enterovirus ou par alignement de séquences (*).

Tableau 12: Test de la réactivité analytique

Entérovirus					
Entérovirus A					
Entérovirus type 71	+	Coxsackievirus A9	+		
Entérovirus B					
Coxsackievirus B1	+	Coxsackievirus B2	+	Coxsackievirus B3	+
Coxsackievirus B4	+	Coxsackievirus B5	+	Échovirus type 6	+
Échovirus type 7	+	Échovirus type 11	+	Échovirus type 20	+
Échovirus type 25	+	Échovirus type 30	+		
Entérovirus C					
Poliovirus type 1	+	Poliovirus type 2	+	Poliovirus type 3	+
Entérovirus D					
Entérovirus type 68*	+				

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2019-05-21	Version précédente
2021-01-29	Révision générale 10. Contrôle qualité (faute de frappe) 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour le diagnostic <i>in vitro</i> .
	Consulter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Référence
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliographie

1. Piqueur M *et al.* Improvement of a real-time PCR assay for the detection of enterovirus RNA. *Virology Journal* 2009, 6: 95-97.
2. ICTV Master Species List 2018 - (10th Report) - Master Species Lists - Master Species Lists - ICTV Collaboration". <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/8266ictvonline.org>. (accessed 22.05.2019)
3. The Pirbright Institute, UK, The Picornavirus Pages (accessed 22.05.2019)
4. De Crom *et al.* Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *Eur J Pediatr* 2016, 175 (8):1023-9.
5. Diop O *et al.* Virologic Monitoring of Poliovirus Type 2 after Oral Poliovirus Vaccine Type 2 Withdrawal in April 2016 — Worldwide, 2016–2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2016. 66, 20. Centers for Disease Control and Prevention.
6. Center for Disease Control and Prevention: Non-Polio Enterovirus infection – Outbreaks & Surveillance.
7. Kiehl H. Infektionen durch Enteroviren. RobertKoch Institut, Kompendium Infektiologie & Infektionsschutz. H. Hoffmann GmbH Verlag 2009.
8. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 7. Oktober 2013. Häufungen von Echovirus-30-bedingten Meningitiden 2013.
9. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 20. Mai 2008. Enterovirus-71-Infektionen: Zum Auftreten der Hand-Fuß-Mund-Krankheit in Südostasien. 2008.

RIDA® GENE Enterovirus

REF PG4705

1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA® GENE Enterovirus è un test di RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta dell'enterovirus da campioni di feci umane e liquido cerebrospinale umano (CSF).¹

Il test di RT-PCR real-time RIDA® GENE Enterovirus è adatto come ausilio nella diagnosi delle infezioni causate da enterovirus (poliovirus, echovirus, coxsackievirus, enterovirus umano 70/71).

2. Sintesi e spiegazione del test

Gli enterovirus appartengono alla famiglia *Picornaviridae* e secondo la classificazione attuale si suddividono in 15 specie (enterovirus A-L e rhinovirus A-C), dove le specie di enterovirus E-L non sono descritte come patogene per l'uomo.^{2,3,4} La specie enterovirus A comprende gli enterovirus umani A e i virus coxsackie A, mentre gli enterovirus B comprendono gli enterovirus umani B, i virus coxsackie B e anche gli echovirus. Inoltre, gli enterovirus umani C, i virus Coxsackie C e i poliovirus fanno parte della specie enterovirus C.^{2,3,4} Gli enterovirus infettano principalmente neonati e bambini e si trasmettono per via oro-fecale ma anche, talvolta, tramite goccioline infette e acqua contaminata. La maggior parte delle infezioni da enterovirus è asintomatica o si manifesta con lievi sintomi simili a quel del raffreddore. Tuttavia, data la moltitudine di specie di enterovirus, le manifestazioni cliniche delle forme sintomatiche gravi sono molto varie. Le infezioni gravi trasmesse dall'enterovirus sono la poliomielite, la malattia mano-piede-bocca, la meningite e miocardite.⁴ I poliovirus sono virus con RNA a filamento singolo (ss-RNA) e prima della loro parziale eradicazione erano diffusi in tutto il mondo. Oltre a sintomi lievi quali febbre e tosse, il poliovirus può anche causare la poliomielite. Nonostante singoli focolai di poliomielite vengano segnalati con una certa regolarità, il numero di casi è in diminuzione in tutto il mondo. Si consideri che nel 2016 sono state registrate solo 37 infezioni da poliovirus di tipo 1 e non è stato riportato alcun caso di infezioni da poliovirus di tipo 3. Il poliovirus di tipo 2 è considerato eradicato da settembre 2015.⁵ I virus coxsackie A e B, che hanno preso il nome dall'omonima località in cui sono stati individuati, nella zona di New York, sono stati segnalati per la prima volta nel 1984. I virus coxsackie sono presenti in tutto il mondo, ed entrambi i ceppi possono causare la cosiddetta "diarrea estiva". Negli Stati Uniti, la malattia mano-piede-bocca

è principalmente causata dal virus coxsackie A16, mentre altre infezioni gravi da coxsackie portano a congiuntivite e miocardite. Oltre al virus coxsackie, anche un'infezione da enterovirus umano 70 può portare a congiuntivite acuta.^{6,7}

L'enterovirus umano 71 causa la malattia mano-piede-bocca; tuttavia, le infezioni trasmesse dall'enterovirus umano 71 sono nella maggior parte dei casi asintomatiche. Questo virus con RNA a filamento singolo (ss-RNA) è distribuito in tutto il mondo e si manifesta per la maggior parte al termine dell'estate e in autunno.^{4,9}

L'echovirus è altamente infettivo e colpisce più spesso i bambini. Tra le altre malattie, l'echovirus può portare la meningite asettica; l'echovirus 30 è il più comune sierotipo causa della meningite in Europa, America e Asia.⁸

3. Principio del test

Il test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Enterovirus è un test diagnostico molecolare per la rivelazione qualitativa diretta di RNA di enterovirus in campioni di feci umane e CSF.

La rivelazione avviene mediante RT-PCR real-time in una singola fase, durante la quale la PCR segue la trascrizione inversa nella stessa provetta di reazione. L'RNA isolato viene trascritto in cDNA mediante trascrittasi inversa. I frammenti genetici specifici di enterovirus (5'-UTR, se presente) vengono successivamente amplificati mediante PCR real-time. I target amplificati vengono rivelati con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la **Taq-Polymerase** rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (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 Enterovirus contiene un **Internal Control RNA** (ICR) quale controllo interno della procedura di preparazione dei campioni e/o per la determinazione della possibile inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tabella 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rosso
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	marrone
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu

5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongellare accuratamente i reagenti prima dell'uso (ad esempio in un frigorifero a 2 - 8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 20 cicli di congelamento/scongellamento senza compromettere i test (ad esempio dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2-8 °C).

6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari

Il test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Enterovirus è adatto per l'uso con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per la PCR real-time elencati di seguito:

Tabella 2: Attrezzatura necessaria

Piattaforma di estrazione	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Strumenti per la PCR real-time	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, LightCycler® 480z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Avvertenze: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se si desidera utilizzare piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time diversi, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) per l'uso con LightCycler® 2.0
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler® 480II o LightCycler® 480z
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (priva di nucleasi)

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

- Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.
- Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test.
- Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose.
- Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test.
- Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si manipolano i campioni o i reagenti.
- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in locali separati per evitare contaminazione crociata.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.
- Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

8. Raccolta e conservazione di campioni

8.1 Preparazione del campione da campioni fecali

Per l'isolamento dell'RNA da campioni di feci umane, utilizzare un kit di estrazione dell'RNA disponibile in commercio (ad es. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione dell'RNA (ad es. Maxwell® RSC (Promega)). Estrarre l'RNA virale in base alle istruzioni del produttore.

Prima dell'estrazione, si raccomanda di diluire il campione di feci con acqua in rapporto 1:10. Vorticare vigorosamente e centrifugare a 13.000 x g per 1 minuto. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il kit RIDA®GENE Enterovirus contiene un **Internal Control RNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'**Internal Control RNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'**Internal Control RNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla Master Mix (vedere Tabella 4).

Se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control RNA** durante la procedura di estrazione.

L'**Internal Control RNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente al campione. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

8.2 Preparazione del campione da CSF

Per l'isolamento dell'RNA da campioni di CSF, utilizzare un kit di estrazione dell'RNA disponibile in commercio (ad es. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione dell'RNA (ad es. Maxwell® RSC (Promega)). Estrarre l'RNA virale in base alle istruzioni del produttore.

Il kit RIDA®GENE Enterovirus contiene un **Internal Control RNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'**Internal Control RNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'**Internal Control RNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla Master Mix (vedere Tabella 4).

Se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control RNA** durante la procedura di estrazione. L'**Internal Control RNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente al campione. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10 % a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tabella 3, Tabella 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, l'**Enzyme Mix**, il **Positive Control**, il **No Template Control** e l'**Internal Control RNA**. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2-8 °C).

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

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mixs	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

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

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
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 con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

9.2 Preparazione della mix per RT-PCR

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

Controllo negativo: dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla RT-PCR Mix del controllo negativo.

Campioni: dispensare 5 µl di eluato nella Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: dispensare 5 µl di **Positive Control** alla Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla RT-PCR Mix del controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione RT-PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tabella 5, Tabella 6).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo universale RT-PCR real-time

Tabella 5: Profilo universale RT-PCR real-time per la serie LightCycler®

<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	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tabella 6: Profilo universale RT-PCR real-time per Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Avvertenze: il profilo per PCR real-time universale può essere utilizzato anche per i test del DNA se i test PCR real-time del DNA RIDA®GENE e dell'RNA RIDA®GENE vengono combinati in un unico ciclo.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 7: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 2.0	Enterovirus	530	È necessario il RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Enterovirus	465/510	È necessario il RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480z	Enterovirus	465/510	È necessario il RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	540/580	
Agilent Techn. Mx3005P	Enterovirus	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento
	ICR	HEX	
ABI 7500	Enterovirus	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Enterovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Enterovirus	Verde	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite
	ICR	Giallo	

10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, i controlli positivo e negativo devono mostrare risultati corretti (vedere Tabella 8, Figura 1).

Il **Positive Control** ha una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5×10^3 copie.

Tabella 8: Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICR	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

*1 Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICR.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test

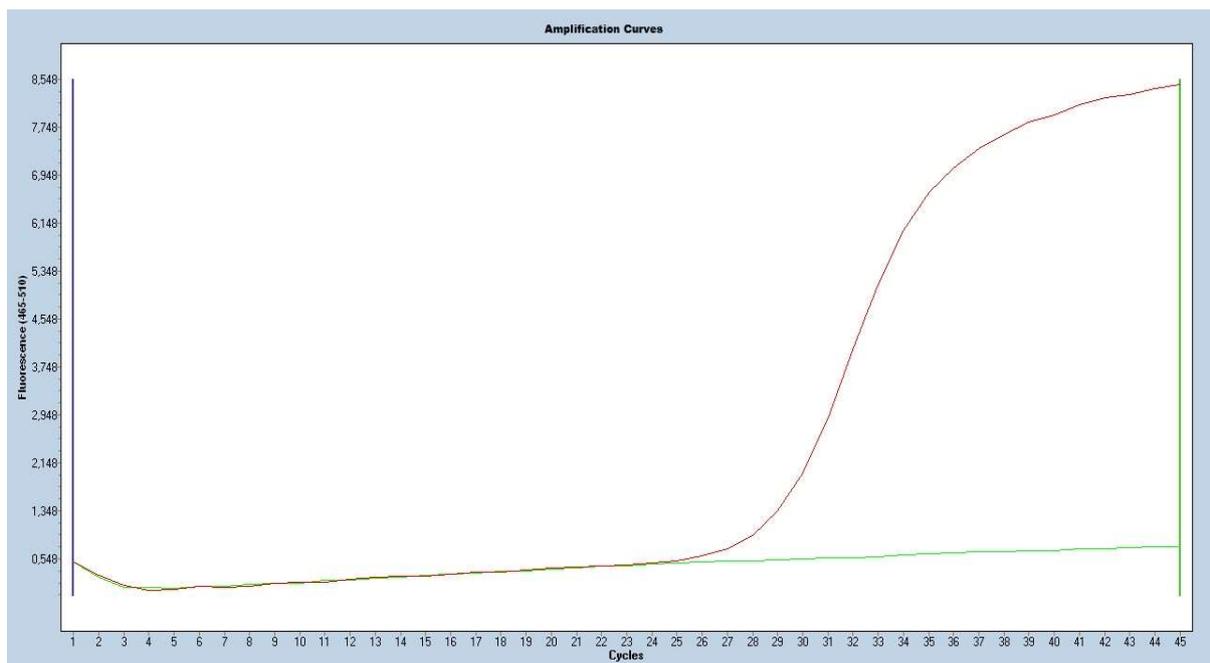


Figura 1: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (Enterovirus) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 9.

Tabella 9: Interpretazione del campione

Gene target		
Enterovirus	ICR	Risultato
positivo	positivo/negativo	Enterovirus rivelato
negativo	positivo	Geni target non rivelati
negativo	negativo	Non valido

Enterovirus è comprovabile se sia l'RNA del campione sia l'Internal Control RNA mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Enterovirus è inoltre comprovabile se l'RNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l'Internal Control RNA nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell'Internal Control RNA non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell'Internal Control RNA sia debole o assente.

Enterovirus non è comprovabile se l'RNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale per l'Internal Control RNA nel sistema di

rivelazione. La rivelazione dell'**Internal Control RNA** esclude l'inibizione della reazione di 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 un inibitore della PCR. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è idoneo solo per campioni fecali umani e campioni di CSF.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rivelazione di nuove varianti e causare un risultato falso negativo con il test RIDA[®]GENE Enterovirus.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza del gene target (5'-UTR).
8. I Rhinovirus appartengono alla famiglia dei *Picornaviridae*. A causa di somiglianza della sequenza non è possibile escludere che il test RIDA[®]GENE Enterovirus mostri reattività incrociata ai Rhinovirus.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Prestazioni cliniche

In uno studio retrospettivo di validazione clinica condotto presso un istituto in Germania abbiamo analizzato 124 campioni fecali umani con il test RIDA®GENE Enterovirus e con un test di PCR real-time interno.

Tabella 10: Confronto tra i risultati relativi all'enterovirus con il test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Enterovirus e con il test di PCR real-time interno di riferimento.

		Test di PCR real-time interno			
		Positivo	Negativo	Totale	
RIDA®GENE Enterovirus	Positivo	40	0	40	PPV: 100,0 %
	Negativo	1	83	84	NPV: 98,8 %
	Totale	41	83	124	

13.2 Sensibilità analitica

Il test di RT-PCR real-time multiplex RIDA® GENE Enterovirus ha un limite di rivelazione maggiore o uguale a 50 copie di RNA per reazione per enterovirus.

La figura 2 seguente mostra una serie di diluizioni di enterovirus (10^5 - 10^1 copie di RNA per μl) su LightCycler® 480II.

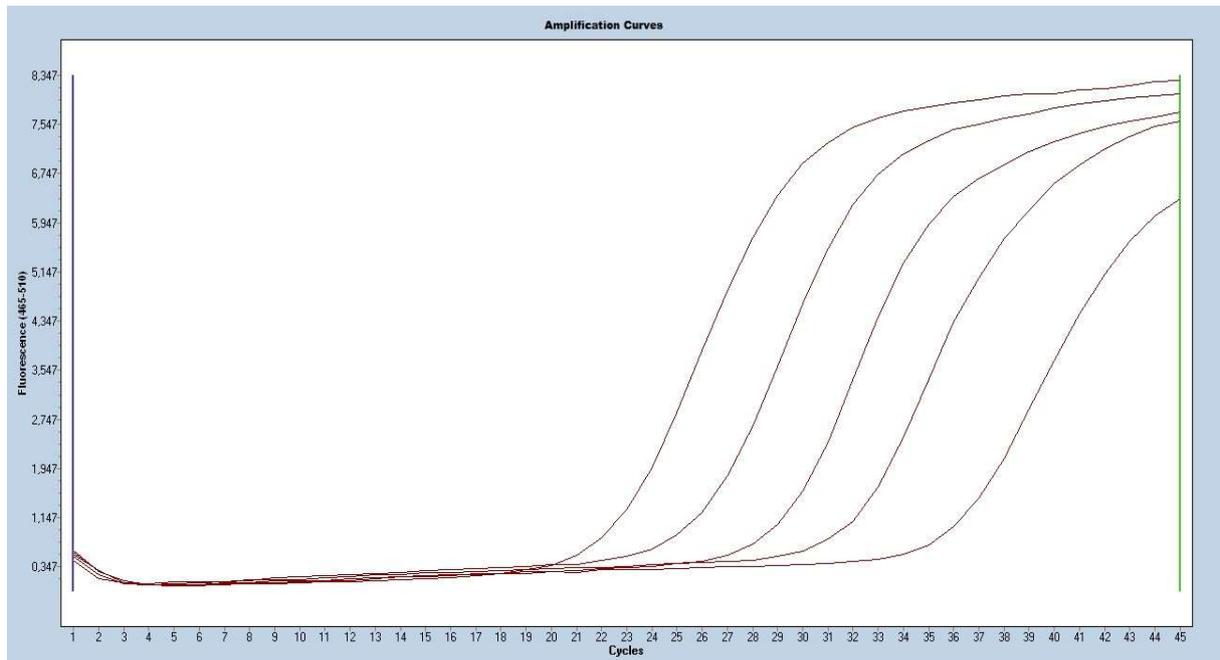


Figura 2: Serie di diluizione dell'enterovirus (10^5 – 10^1 copie di RNA per μl) sul LightCycler® 480II

Il limite di rivelazione dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione dell'RNA e dalla concentrazione di RNA.

13.3 Specificità analitica

La specificità analitica del test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Enterovirus è specifica per l'enterovirus in campioni di feci umane. Non è stata individuata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 11):

Tabella 11: Test di reattività crociata

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Clostridium bifirmentans</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i>	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	Metapneumovirus, umano	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Virus dell'herpes simplex 1, ceppo McIntyre	-
Astrovirus	-	Coronavirus 229E, umano	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Virus dell'herpes simplex 2 ceppo MS	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG I	-	Virus dell'influenza A/PR/8/34	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GG II	-	Virus Epstein Barr, ceppo B95-8	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Cytomegalovirus, umano	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	Virus parainfluenzale umano 1, ceppo C35	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Virus parainfluenzale umano 2, ceppo Greer	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Rinovirus, umano, genogruppo A	-	Virus parainfluenzale umano 4b, ceppo CH19503	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavirus	-	Virus parainfluenzale umano, sierotipo 3	-

<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo 9320	-
<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo Long	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	Virus Varicella Zoster (tipo B)	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-				

13.4 Reattività analitica

La reattività del test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Enterovirus è stata valutata rispetto a più ceppi di enterovirus (vedere Tabella 12). Tutti i ceppi del panel sono stati rivelati dal test RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Enterovirus o mediante allineamento di sequenze (*).

Tabella 12: Test di reattività analitica

Enterovirus					
Enterovirus A					
Enterovirus Tipo 71	+	Coxsackievirus A9	+		
Enterovirus B					
Coxsackievirus B1	+	Coxsackievirus B2	+	Coxsackievirus B3	+
Coxsackievirus B4	+	Coxsackievirus B5	+	Echovirus Tipo 6	+
Echovirus Tipo 7	+	Echovirus Tipo 11	+	Echovirus Tipo 20	+
Echovirus Tipo 25	+	Echovirus Tipo 30	+		
Enterovirus C					
Poliovirus Tipo 1	+	Poliovirus Tipo 2	+	Poliovirus Tipo 3	+
Enterovirus D					
Enterovirus Tipo 68*	+				

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2019-05-21	Versione precedente
2021-01-29	Revisione generale 10. Controllo qualità (errore d'ortografia) 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica <i>in vitro</i>
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici nel test

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliografia

1. Piqueur M *et al.* Improvement of a real-time PCR assay for the detection of enterovirus RNA. *Virology Journal* 2009, 6: 95-97.
2. ICTV Master Species List 2018 - (10th Report) - Master Species Lists - Master Species Lists - ICTV Collaboration". <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/8266ictvonline.org>. (accessed 22.05.2019)
3. The Pirbright Institute, UK, The Picornavirus Pages (accessed 22.05.2019)
4. De Crom *et al.* Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *Eur J Pediatr* 2016, 175 (8):1023-9.
5. Diop O *et al.* Virologic Monitoring of Poliovirus Type 2 after Oral Poliovirus Vaccine Type 2 Withdrawal in April 2016 — Worldwide, 2016–2017. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2016. 66, 20. Centers for Disease Control and Prevention.
6. Center for Disease Control and Prevention: Non-Polio Enterovirus infection – Outbreaks & Surveillance.
7. Kiehl H. Infektionen durch Enteroviren. RobertKoch Institut, Kompendium Infektiologie & Infektionsschutz. H. Hoffmann GmbH Verlag 2009.
8. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 7. Oktober 2013. Häufungen von Echovirus-30-bedingten Meningitiden 2013.
9. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 20. Mai 2008. Enterovirus-71-Infektionen: Zum Auftreten der Hand-Fuß-Mund-Krankheit in Südostasien. 2008.