

RIDA® GENE Flu & RSV

REF PG0545



1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica in vitro. Il test RIDA®GENE Flu & RSV, eseguito su Roche LightCycler® 480II, è un test RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dell'RNA del virus dell'influenza (influenza A e influenza B) e dell'RNA del virus respiratorio sinciziale (RSV A e B) in tamponi umani nasali/faringei e BAL di soggetti che presentano segni e sintomi di infezione respiratoria acuta.

Il test RIDA®GENE Flu & RSV ha lo scopo di supportare la diagnosi differenziale delle infezioni causate da virus influenzali (influenza A e influenza B) e virus respiratori sinciziali (RSV A e B) in pazienti con sintomi di un'infezione respiratoria in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono l'infezione da virus influenzali (influenza A, influenza B) o virus respiratori sinciziali (RSV A e B) e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi. Il prodotto è destinato all'uso da parte di professionisti che lavorano in laboratori ospedalieri, laboratori di riferimento, privati o pubblici.

2. Sintesi e spiegazione del test

L'influenza è una delle malattie infettive respiratorie più significative ed è causata dai virus influenzali.

In tutto il mondo da tre a cinque milioni di persone contraggono l'influenza ogni anno e circa 290.000 - 650.000 persone muoiono a causa della malattia. Le epidemie influenzali annuali possono avere un impatto importante sul sistema sanitario e sull'economia.¹

Nella stagione 2018/19, si stima che il numero di visite mediche correlate all'influenza in Germania sia stato di circa 3,8 milioni. Il numero di ricoveri correlati all'influenza da pratiche di assistenza primaria è stato stimato in 18.000 casi.²

Il gruppo di lavoro sull'influenza (AGI) del Robert Koch Institute stima che ogni anno si effettuino da uno a sette milioni di visite mediche legate all'influenza. Durante una grave ondata di influenza, come nella stagione 2012/13, ci sono stati circa 30.000 ricoveri correlati all'influenza e 20.000 decessi. Al contrario, gli anni con epidemie meno gravi (come il 2013/14) hanno visto solo 3.000 ricoveri stimati e la mortalità in eccesso associata all'influenza non è stata rivelata.³

I virus influenzali sono virus a RNA appartenenti alla famiglia degli Orthomyxoviridae e sono suddivisi nei sottotipi A, B e C. Caratteristica dei virus influenzali è l'elevata variabilità degli antigeni di superficie emoaagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA), dovuta a mutazioni (deriva antigenica). I tipi di influenza A e B causano le epidemie influenzali annuali, mentre le infezioni da virus dell'influenza C causano solo malattie lievi.

Da un punto di vista epidemiologico, i virus dell'influenza A sono i più importanti in ragione della loro diversità: sono infatti responsabili di tre pandemie nel XX secolo e della maggior parte delle epidemie di influenza. La maggior parte delle infezioni da

virus influenzale A nell'uomo è causata dai sottotipi H1N1 e H3N2. Oltre alla deriva antigenica risultante dalla mutazione, la mescolanza di ceppi umani e non umani di influenza A può creare nuovi sottotipi di influenza A (spostamento antigenico), che possono innescare una pandemia. Il sottotipo dell'influenza A H1N1 è associato con le pandemie del passato e con potenziali nuove pandemie di influenza (ad esempio l'influenza spagnola del 1918/19 e l'influenza suina del 2009). Oggi questo sottotipo dell'influenza A è noto come H1N1v. La trasmissione dei virus influenzali avviene attraverso goccioline e aerosol. Il periodo di incubazione è di 2-4 giorni. I sintomi clinici sono gravi, principalmente malattie delle vie respiratorie accompagnate da tosse e febbre alta. È tipica l'insorgenza dei sintomi improvvisa. Quando il decorso della malattia è grave possono instaurarsi polmonite e superinfezioni batteriche dall'esito potenzialmente fatale, in particolare nelle persone anziane e nei bambini.⁴

I virus respiratori sinciziali (RSV) appartengono alla famiglia *Pneumoviridae* e sono virus rivestiti a filamento singolo di RNA (ssRNA). Circolano due gruppi di RSV: A e B, con RSV A predominante nella maggior parte degli anni.⁵

L'RSV è un agente patogeno diffuso a livello mondiale e può causare malattie del tratto respiratorio superiore e inferiore a qualsiasi età. Nei neonati (in particolare nei prematuri) e nei bambini piccoli, l'RSV è uno dei più importanti patogeni delle infezioni del tratto respiratorio.⁵ L'RSV si trasmette per contatto o tramite goccioline infette e si manifesta con sintomi quali rinite, raffreddore, tosse, bronchite acuta e anche infezione dell'orecchio medio. Se è presente una superinfezione batterica può verificarsi un decorso acuto.⁶ I bambini piccoli e i neonati presentano spesso un caso grave che richiede il ricovero in ospedale. I sintomi includono febbre, congestione nasale e tachipnea. Si stima che l'incidenza delle infezioni da RSV a livello mondiale sia di 48,5 casi e 5,6 casi gravi ogni 1.000 bambini nel primo anno di vita. Mentre dal 50 al 70% dei neonati e dei bambini piccoli presenta un'infezione da RSV nel primo anno di vita, quasi il 100% ne ha avuta una dopo il secondo anno di vita.⁵

3. Principio del test

Il test RIDA®GENE Flu & RSV è un test RT-PCR multiplex real-time per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dell'RNA del virus dell'influenza (influenza A e influenza B) e dell'RNA del virus respiratorio sinciziale (RSV A e B) in tamponi umani nasali e faringei e BAL (vedere Sezione 9.4). La rivelazione avviene mediante RT-PCR real-time in una singola fase: la trascrizione inversa (RT) e la successiva PCR hanno luogo nella medesima cuvetta di reazione. Nel processo, l'RNA isolato viene trascritto in cDNA con l'ausilio di una trascrittasi inversa. I frammenti genetici specifici per l'influenza A, l'influenza B e l'RSV (influenza A/B: gene M e gene NP1; RSV: gene F) vengono quindi amplificati mediante PCR real-time. Le sequenze target amplificate vengono rivelate con sonde a idrolisi etichettate con un quencher a un'estremità e un colorante reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. In presenza di una sequenza target le sonde ibridano con l'amplicone. Durante l'estensione, la **Taq-Polymerase** separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-

time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA®GENE Flu & RSV contiene un **Internal Control RNA** (ICR) per verificare la preparazione del campione e/o la potenziale 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

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

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

Il test RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Flu & RSV è stato verificato con la seguente combinazione di piattaforme di estrazione e dispositivi per PCR real-time:

Tabella 2a: Attrezzatura necessaria (verificata)

Tamponi di estrazione	
Promega	Maxwell® RSC
Dispositivi di PCR real-time	
Roche	LightCycler® 480II

Inoltre, il test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Flu & RSV è compatibile con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per PCR real-time elencati di seguito:

Tabella 2b: Attrezzatura necessaria (compatibile)

Tamponi di estrazione	
R-Biopharm	RIDA®Xtract
Dispositivi di PCR real-time	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: quando si utilizza il Rotor-Gene Q (QIAGEN), utilizzare solo cuvette di reazione da 0,1 ml.

Se si desidera utilizzare altre procedure di estrazione o dispositivi per la PCR real-time diversi, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de per verificare la compatibilità.

- Sistema di raccolta di tamponi sterili (ad esempio, eSwab® mezzo di coltura Amies, Copan Diagnostic Inc.)
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per LightCycler® 480II
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, cuvette di reazione, pellicole)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione o piastre
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Puntali per pipette con filtri
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (priva di nucleasi)

7. Avvertenze e misure precauzionali

Solo per la diagnostica *in vitro*.

- Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.
- Nell'esecuzione del test, attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.
- Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.
- Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test.
- Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.
- Assicurarsi che l'estrazione, la preparazione della PCR e la PCR avvengano in locali separati per evitare contaminazioni incrociate.
- I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.
- Dopo la data di scadenza smaltire il kit.
- Gli operatori sono responsabili del corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Per ulteriori dettagli consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) su www.r-biopharm.com.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

8.1 Preparazione dell'RNA da tamponi nasali e faringei

Per la preparazione dell'RNA da tamponi nasali e faringei si raccomanda un kit di estrazione dell'acido nucleico reperibile in commercio (come RIDA[®]Xtract [R-Biopharm]) o un sistema di estrazione dell'acido nucleico (come Maxwell[®] RSC [Promega]). Attenersi alle istruzioni del produttore.

Si consiglia di utilizzare la quantità di mezzo di coltura specificata dal produttore del kit di estrazione dell'acido nucleico o del sistema di estrazione dell'acido nucleico e di seguire le istruzioni del produttore. Il test RIDA[®]GENE Flu & RSV contiene un **Internal Control RNA** che indica l'inibizione potenziale della PCR, verifica l'integrità dei reagenti e conferma l'avvenuta estrazione dell'acido nucleico.

L'**Internal Control RNA** può essere utilizzato come solo controllo di inibizione oppure come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione.

Se l'**Internal Control RNA** viene utilizzato solo come controllo di inibizione, è necessario aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla Master Mix di ogni reazione (vedere Tabella 4).

Se l'**Internal Control RNA** viene utilizzato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, durante l'estrazione devono essere utilizzati 20 µl di **Internal Control RNA** per ogni campione.

L'**Internal Control RNA** deve essere aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi e **non** direttamente al materiale del campione. Raccomandiamo di pipettare 1 µl di **Internal Control RNA** per reazione nella PCR Mix sia per il controllo negativo, sia per il controllo positivo.

8.2 Preparazione dell'RNA dal BAL

Per la preparazione dell'RNA dal BAL si raccomanda un kit di estrazione dell'acido nucleico reperibile in commercio (come RIDA[®]Xtract [R-Biopharm]) o un sistema di estrazione dell'acido nucleico (come Maxwell[®] RSC [Promega]). Attenersi alle istruzioni del produttore.

Si consiglia di utilizzare la quantità di mezzo di coltura specificata dal produttore del kit di estrazione dell'acido nucleico o del sistema di estrazione dell'acido nucleico e di seguire le istruzioni del produttore. Il test RIDA[®]GENE Flu & RSV contiene un **Internal Control RNA** che indica l'inibizione potenziale della PCR, verifica l'integrità dei reagenti e conferma l'avvenuta estrazione dell'acido nucleico.

L'**Internal Control RNA** può essere utilizzato come solo controllo di inibizione oppure come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione.

Se l'**Internal Control RNA** viene utilizzato solo come controllo di inibizione, è necessario aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla Master Mix di ogni reazione (vedere Tabella 4). Se l'**Internal Control RNA** viene utilizzato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, durante l'estrazione devono essere utilizzati 20 µl di **Internal Control RNA** per ogni campione. L'**Internal Control RNA** deve essere aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi e **non** direttamente al materiale del campione. Raccomandiamo di pipettare 1 µl di **Internal Control RNA** per reazione nella PCR Mix sia per il controllo negativo, sia per il controllo positivo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

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

L'aggiunta di un ulteriore 10% di volume alla Master Mix è consigliata per compensare la perdita della pipetta (vedere Tabella 3 e Tabella 4). Prima dell'uso, scongelare la **Reaction Mix**, l'**Enzyme Mix**, il **Positive Control**, il **No Template Control** e l'**Internal Control RNA**, miscelare accuratamente (ad eccezione del **Enzyme Mix**) e

centrifugare brevemente. Raffreddare adeguatamente i reagenti durante le fasi di lavoro (da 2 a 8 °C).

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

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

Mescolare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

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

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10%)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

Mescolare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

9.2 Preparazione della PCR Mix

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

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

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

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

Controllo positivo: Dispensare 5 µl di **Positive Control** nella Master Mix pre-pipettata.

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

Chiudere le cuvette o le piastre di reazione, centrifugare brevemente a bassa velocità e trasferire nel dispositivo per PCR real-time. Avviare la PCR in base alle impostazioni dello strumento per PCR (vedere Tabella 5, Tabella 6, Tabella 7, Tabella 8).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo universale RT-PCR real-time

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

<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

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

Tabella 6: Profilo RT-PCR real-time universale per Mx3005P, ABI 7500 Fast Dx, 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

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

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

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 7: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Dispositivo di PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Commento
R-Biopharm RIDA®CYCLER	RSV A/B	Verde	-
	ICR	Giallo	
	Influenza B	Arancione	
	Influenza A	Rosso	
Roche LightCycler® 480II	RSV A/B	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	533/580	
	Influenza B	533/610	
	Influenza A	618/660	
Agilent Technologies Mx3005P	RSV A/B	FAM	Impostare il colorante di riferimento su none (nessuno).
	ICR	HEX	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
ABI 7500 Fast Dx	RSV A/B	FAM	Impostare il colorante di riferimento passivo ROX su nessuno.
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	RSV A/B	FAM	-
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	RSV A/B	Verde	Il guadagno deve essere impostato su 5 (impostazione di fabbrica) per tutti i canali.
	ICR	Giallo	
	Influenza B	Arancione	
	Influenza A	Rosso	

10. Controllo qualità

I campioni vengono valutati utilizzando il software di analisi del dispositivo per PCR real-time in base alle istruzioni del produttore. Il controllo negativo e il controllo positivo devono mostrare i risultati corretti (vedere la Tabella 8, Figura 1, Figura 2 e Figura 3).

Il **Positive Control** arriva a una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. Viene utilizzato in una quantità totale di 5×10^3 copie in ogni esecuzione di PCR.

Tabella 8: Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

Campione	Risultato	Ct ICR	Gene Ct target
Controllo positivo	Positivo	N/A *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct >20	Non rivelabile

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

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

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

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

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata
- Procedura di esecuzione del test corretta

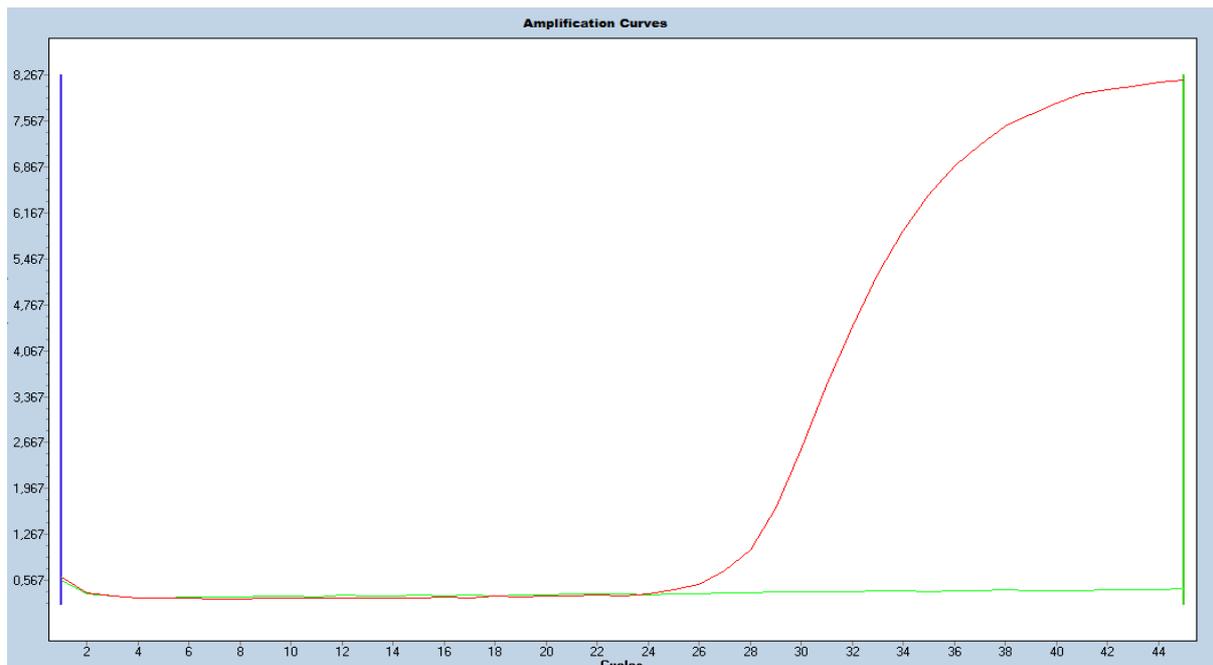


Figura 1: Esecuzione corretta del controllo (RSV) positivo (rosso) e negativo (verde) sul LightCycler® 480II

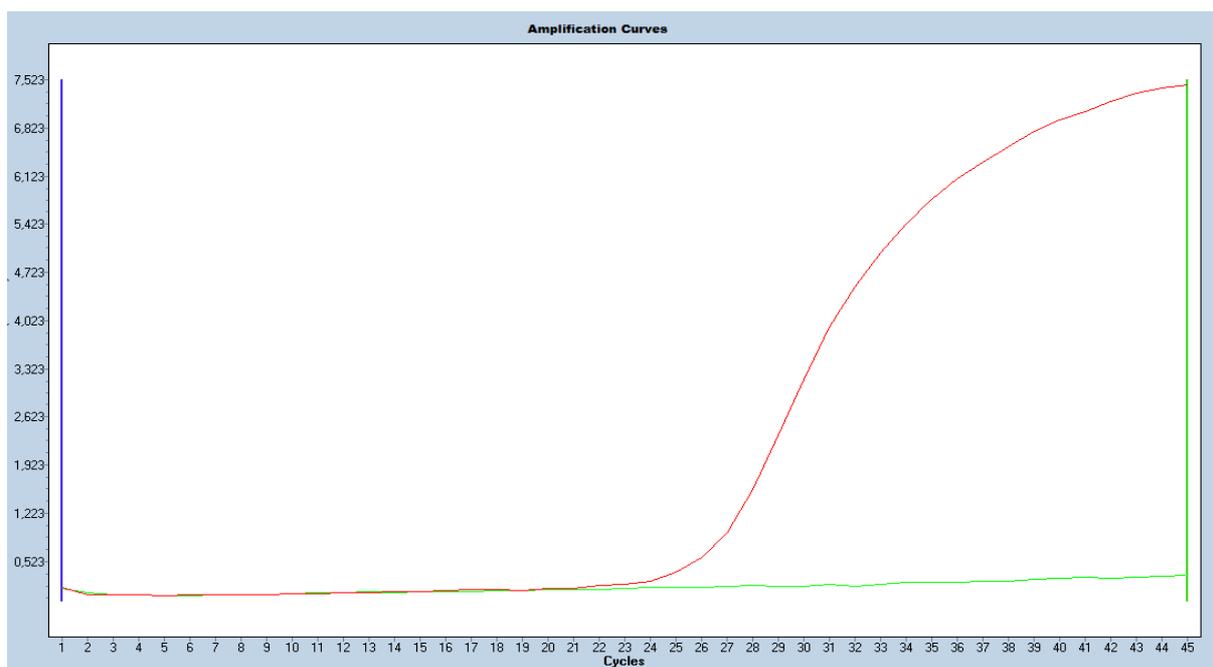


Figura 2: Esecuzione corretta del controllo (influenza B) positivo (rosso) e negativo (verde) sul LightCycler® 480II

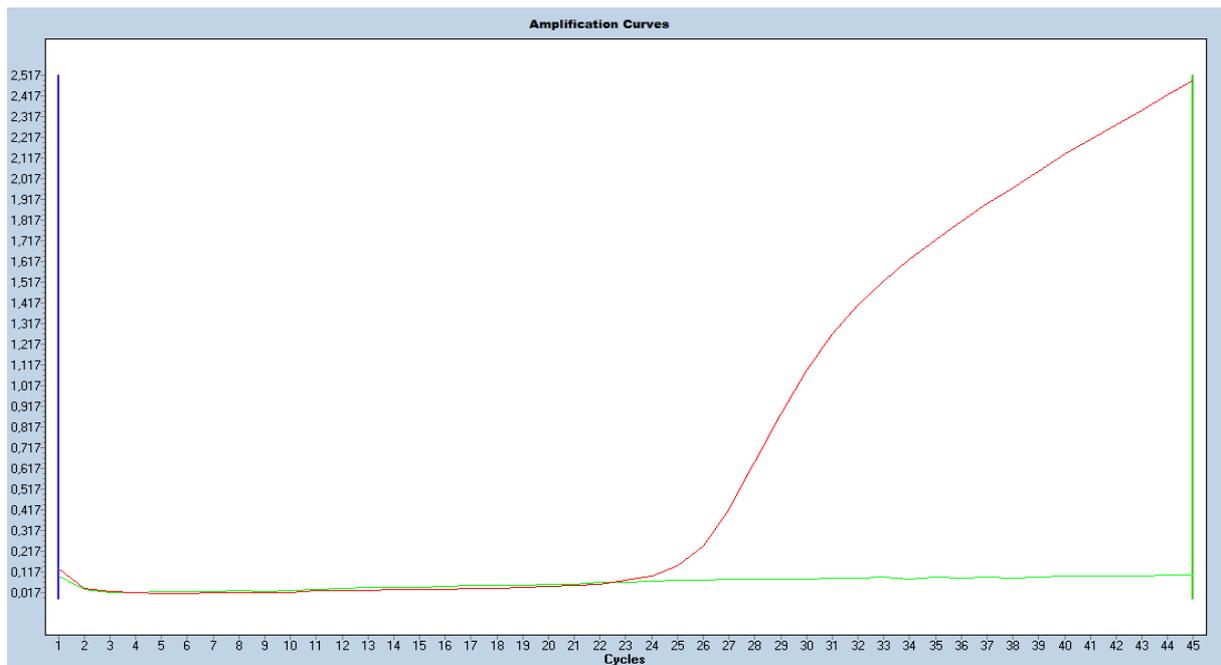


Figura 3: Esecuzione corretta del controllo (influenza A) positivo (rosso) e negativo (verde) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del campione

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 9.

Tabella 9: Interpretazione del campione

Rivelazione di			ICR	Risultato
Gene F (RSV A / B)	Gene NP1 (influenza B)	Gene M (influenza A)		
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	Rivelabile RSV
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	Rivelabile influenza B
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	Rivelabile influenza A
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	Rivelabili RSV e influenza B
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	Rivelabili RSV e influenza A
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	Rivelabili influenza B e influenza A
positivo	positivo	positivo	positivo	Rivelabili influenza A, influenza B e RSV
negativo	negativo	negativo	positivo	Gene target non rivelabile
negativo	negativo	negativo	negativo	Non valido

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

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

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

Un campione non è valido se né l'RNA del campione né l'**Internal Control RNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene inibitori della PCR nel campione o si è verificato un errore durante il processo di estrazione. Il campione estratto deve essere diluito 1:10 con acqua per PCR e

nuovamente amplificato oppure è necessario migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Questo test è destinato solo a tamponi nasali/faringei e BAL.
2. Procedure inadeguate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni al di sotto della sensibilità analitica del test possono produrre falsi negativi.
3. La presenza di inibitori della PCR può condurre a risultati non valutabili.
4. Mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione di varianti nuove o sconosciute e possono portare a risultati falsi negativi utilizzando RIDA®GENE Flu & RSV.
5. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, concentrazioni estremamente basse delle sequenze target, sotto il limite di rivelazione (LoD), possono essere rivelate, ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.
6. Questo test non è idoneo per rivelare i virus dell'influenza C.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi in grado di riprodursi. Un risultato positivo indica la presenza del gene target (influenza A/B: gene M e gene NP1; RSV: Gene F).
8. A una concentrazione testata del 3,0% e superiore, la paracodina mostra un effetto inibitorio.
9. A una concentrazione testata di 17,5 mg/ml e superiore, la ciprofloxacina mostra un effetto inibitorio.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Flu & RSV ha un limite di rivelazione di ≥ 50 copie di RNA per reazione per RSV, influenza B e influenza A.

Le Figure 4, 5 e 6 di seguito mostrano le serie di diluizioni di RSV, influenza B e influenza A (ciascuna con 5×10^5 a 5×10^1 copie di RNA per reazione) sul LightCycler® 480II.

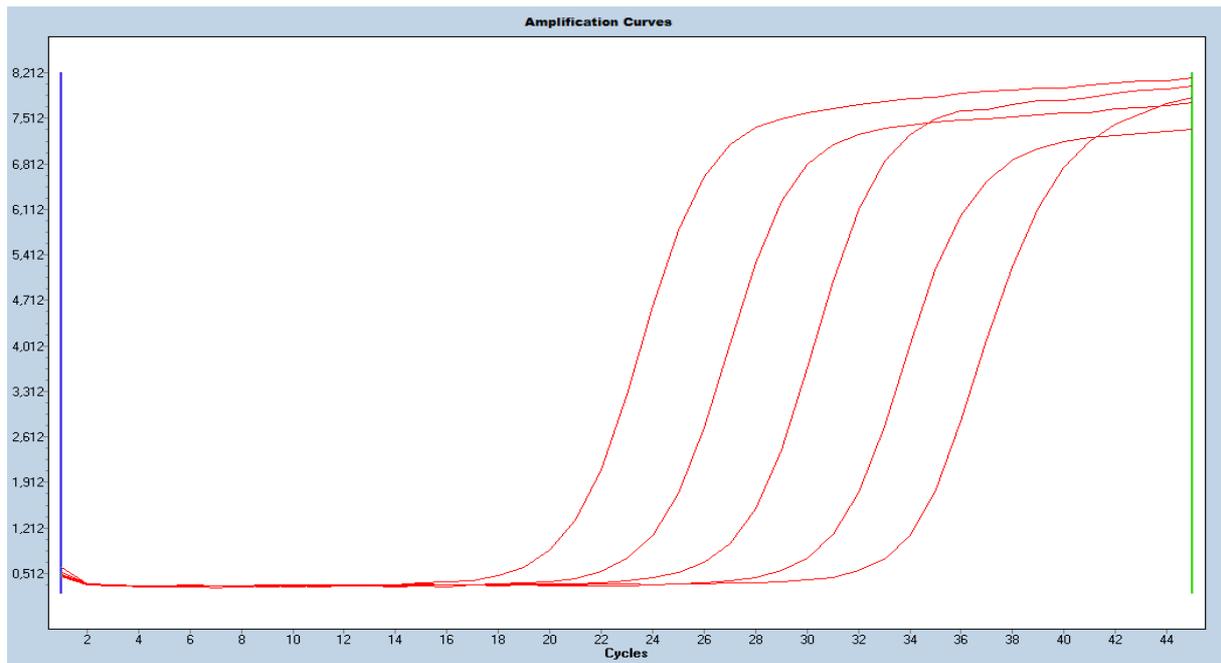


Figura 4: Serie di diluizioni di RSV (da 5×10^5 a 5×10^1 copie di RNA per reazione) su LightCycler® 480II

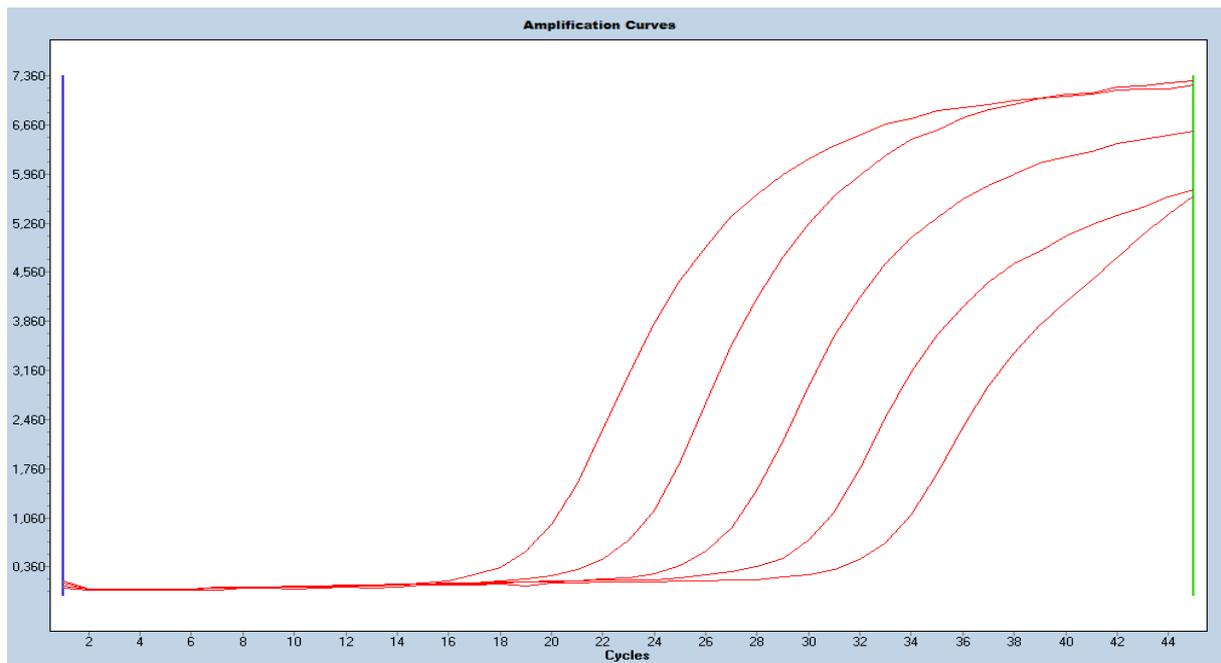


Figura 5: Serie di diluizioni di influenza B (da 5×10^5 a 5×10^1 copie di RNA per reazione) su LightCycler® 480II

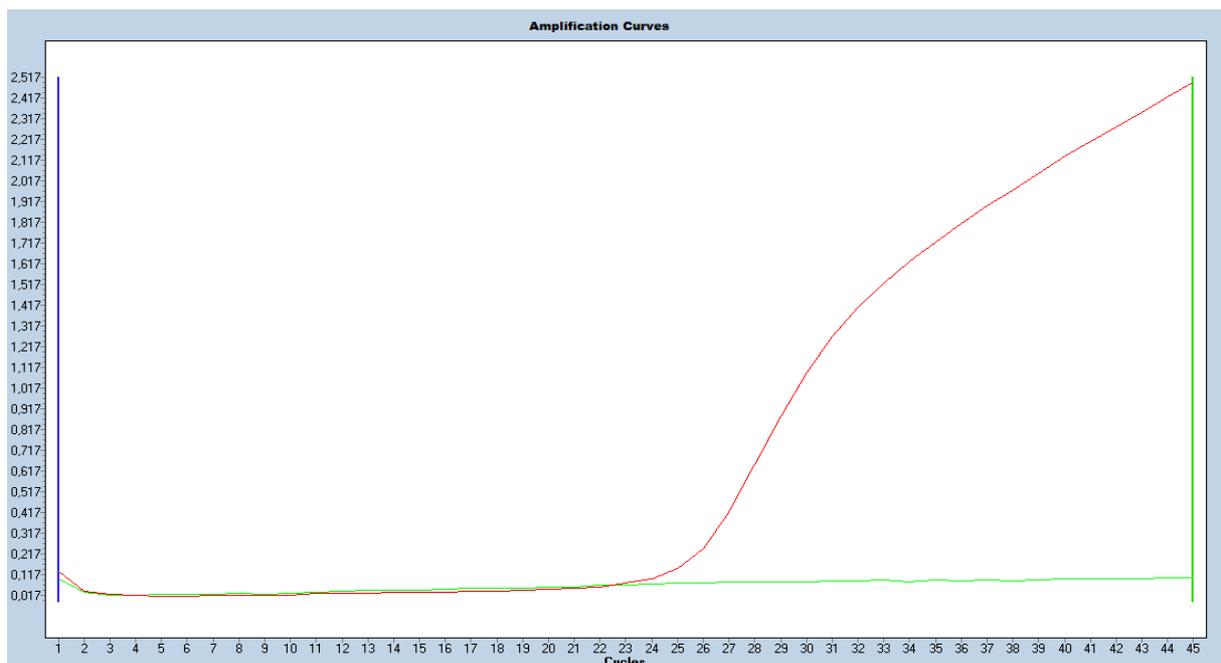


Figura 6: Serie di diluizioni di influenza A (da 5×10^5 a 5×10^1 copie di RNA per reazione) su LightCycler® 480II

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

13.2 Specificità analitica

test RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Flu & RSV è specifico per RSV A/B, influenza A e influenza B. Non sono state rivelate reattività incrociate con le seguenti specie (vedere Tabella 10).

Tabella 10: Test di reattività incrociati

<i>Acinetobacter baumannii</i> , ceppo 5377	-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	Coxsackie B4 umano	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (NATrol Recombinant External Run Control)	-
Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	Echovirus Tipo 11	-	Cytomegalovirus umano	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 4	-	Virus di Epstein-Barr, ceppo B95-8	-	Metapneumovirus umano	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	-	Virus parainfluenzale umano 1, ceppo C35	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
Adenovirus 31	-	<i>Escherichia coli</i> (O6)	-	Virus parainfluenzale umano 2, ceppo Greer	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , ceppo NCTC 7465	-
Adenovirus 34	-	<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	Virus parainfluenzale umano, sierotipo 3	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Adenovirus 37	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Virus parainfluenzale umano 4a, ceppo M-25	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Aspergillus terreus</i>		Enterovirus tipo 71, ceppo 2003 isolato		Rhinovirus umano genogruppo A		<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Bordetella parapertussis</i> , ceppo 12822	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ceppo MGH 78578	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-

<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	Virus dell'herpes simplex 1, ceppo McIntyre	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-		
<i>Candida albicans</i>	-	Virus dell'herpes simplex 2, ceppo MS	-	<i>Legionella pneumophila</i> sottosp. Pneumophila	-		
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Coronavirus OC43 umano	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-		
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	Coronavirus 229E umano	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , ceppo FH di agente Eaton	-		
<i>Clostridium perfringens</i>	-	Coxsackievirus umano A2, ceppo Fleetwood	-	<i>Neisseria meningitidis</i> , ceppo FAM18	-		

13.4 Reattività analitica

La reattività del test RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Flu & RSV è stata valutata rispetto a più ceppi di virus dell'influenza A/influenza B e dell'RSV (vedere Tabella 11).

Tabella 11: Test di reattività analitica

Sottotipo	Ceppo	RSV	Influenza B	Influenza A
H1N1v	Influenza A/Brisbane/02/2018	negativo	negativo	positivo
H1N1v	Influenza A/Michigan/45/2015	negativo	negativo	positivo
H1N1v	Influenza A/California/7/2009	negativo	negativo	positivo
H1N1	Influenza A/Brisbane/59/2007	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Kansas/14/2017	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016	negativo	negativo	positivo
H3N2	A/Hong Kong/4801/2014	negativo	negativo	positivo

H3N2	Influenza A/ Switzerland/9715293/2013	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Texas/50/2012	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Victoria/361/2011	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Perth/16/2009	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/Brisbane/10/2007	negativo	negativo	positivo
H3N2	Influenza A/South Australia/34/ 2019	negativo	negativo	positivo
H7N9	Influenza A/Anhui/1/2013	negativo	negativo	positivo
	Influenza B/Colorado/06/2017/ Victoria lineage	negativo	positivo	negativo
	Influenza B/Brisbane/60/2008/ Victoria lineage	negativo	positivo	negativo
	Influenza B/Washington/02/2019/ Victoria lineage	negativo	positivo	negativo
	Influenza B/ Massachusetts/2/2012/ Yamagata lineage	negativo	positivo	negativo
	Influenza B/Phuket/3073/2013/ Yamagata lineage	negativo	positivo	negativo
	Influenza B/Wisconsin/1/2010/ Yamagata lineage	negativo	positivo	negativo
	RSV A (isolato: 2006)	positivo	negativo	negativo
	RSV A, ceppo lungo	positivo	negativo	negativo
	RSV B (ceppo: CH93(18)-18)	positivo	negativo	negativo
	RSV B ceppo 9320	positivo	negativo	negativo

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e denominazione
2014-07-01	Versione precedente
2020-10-13	Revisione generale: 1. Campo di applicazione 2. Sintesi e spiegazione del test 4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti necessari ma non in dotazione 8. Raccolta e conservazione dei campioni 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 11. Interpretazione del campione 12. Limiti del metodo 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli 16. Bibliografia

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Uso per la diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici del test

Reaction Mix

Enzyme Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliografia

1. World Health Organisation 2009, Fact Sheet N°211, Influenza (Saisonal)
www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html. Last accessed: 09.10.2020.
2. Robert Koch Institut
RKI_Influenzabericht_2018-19
https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/6253/RKI_Influenzabericht_2018-19.pdf. Last accessed: 30.10.2020
3. Robert Koch Institut
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza_saisonal.html. Last accessed: 09.10.2020.
4. World Health Organisation 2011, Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.
5. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_RSV.html
Last accessed: 15.10.2020