

RIDA® GENE RSV & hMPV

REF PG5905



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Deutschland

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



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Der RIDA®GENE RSV & hMPV Test, der auf dem Roche LightCycler® 480 II durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von respiratorischer Syncytial Virus (A/B) und humaner Metapneumovirus (A/B) RNA aus unbehandelten humanen Nasen-/Rachenabstrichen und BAL von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer akuten respiratorischen Infektion.

Der RIDA®GENE RSV & hMPV Test ist zur Unterstützung der Diagnose von Virus-Infektionen (RSV & hMPV) bei Patienten mit Symptomen einer respiratorischen Infektion in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen.

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit RSV oder hMPV nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden.

Das Produkt ist für die professionelle Anwendung vorgesehen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Das humane respiratorische Syncytial Virus (RSV) gilt als einer der wichtigsten Erreger akuter Infektionen der unteren Atemwege, wie Lungenentzündung und Bronchiolitis^(1,2,3). Eine hohe Häufigkeit von RSV-Infektionen wurde insbesondere bei Kindern unter 6 Monaten festgestellt^(4,5). RSV ist nicht nur bei Kindern, sondern auch bei älteren Menschen, Patienten mit Vorerkrankungen und immungeschwächten Erwachsenen mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität verbunden^(2,6). RSV ist ein nicht segmentiertes, umhülltes RNA-Virus, das zur Familie der Pneumoviridae gehört^(2,3). Das virale Genom, ein einzelsträngiges RNA (ssRNA)-Molekül, kodiert für 11 Proteine⁽⁶⁾. Die Gattung wird aufgrund der Antigenität ihres G-Proteins in zwei antigene Gruppen eingeteilt: RSV-A und -B. Derzeit sind 14 Genotypen von RSV-A und 25 Genotypen von RSV-B bekannt^(2,6). Mehrere Studien kommen übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass RSV das am häufigsten nachgewiesene Atemwegsvirus ist^(2,6,7). Insbesondere treten RSV-Ausbrüche in der Wintersaison von November bis März auf. Der Höhepunkt der Infektionen wird vor allem im Januar erreicht^(1,3,8). RSV tritt in der Regel zusammen mit anderen Atemwegsviren auf^(2,3).

Das humane Metapneumovirus (hMPV) wurde erstmals im Jahr 2001 aus Atemwegsproben von Kindern unter 5 Jahren isoliert⁽⁹⁾. Das humane Metapneumovirus ist ein umhülltes Viruspartikel, das wie RSV zur Familie der Pneumoviridae gehört. Das virale Genom ist eine einzelsträngige RNA (ssRNA), die aus 8 Genen besteht. Die Gattung hMPV wurde in zwei verschiedene Genotypen A und B unterteilt. Jede Gruppe wird weiter in zwei Subgenotypen 1 und 2 (A1, A2, B1, B2) eingeteilt, die auf genetischen Unterschieden bei den Oberflächenproteinen F und G beruhen. Beide Genotypen können im gleichen Zeitraum koexistieren und gleichzeitig zirkulieren, wobei Gruppe A in der Regel der vorherrschende Genotyp ist. Die Verteilung hängt jedoch von der Saisonalität und der Region ab^(3,5,9,10). hMPV-

Infektionen können das ganze Jahr über auftreten, aber in der Regel sind Infektionsspitzen am Ende der Wintersaison üblich. Dabei zeigt sich eine klare Saisonalität, insbesondere mit hohen Infektionsraten im Januar^(9,11). Koinfektionen mit anderen Erregern der Atemwege, z. B. dem respiratorischen Syncytial Virus (RSV), wurden bereits mehrfach beschrieben⁽⁹⁾.

RSV und hMPV sind Studien zufolge neben der Influenza die vorherrschenden viralen Erreger während der Wintersaison und zeigen somit eine beständige Saisonalität⁽¹²⁾. Die häufigsten Symptome bei akuten Atemwegsinfektionen sind Fieber, Husten, Halsschmerzen, Kopfschmerzen, Tachypnoe, Rasselgeräusche, Stridor, Keuchen oder Symptome der oberen Atemwege (Rhinorrhoe und Niesen) und Abgeschlagenheit^(9,11).

3. Testprinzip

Der RIDA®GENE RSV & hMPV Test ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von respiratorischer Syncytial Virus (A/B) und humaner Metapneumovirus (A/B) RNA aus humanen Nasen-/Rachenabstrichen und BAL.

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

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung sind ausreichend für 100 Bestimmungen.

Tab. 1: Packungsinhalt

REF	Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
PGZ5905RM	1	Reaction Mix	2 ×	1050 µl	gelb, gebrauchsfertig
PGZ5905EM	2	Enzyme Mix	1 ×	80 µl	rot, gebrauchsfertig
PGZ5905IC	R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µl	orange, gebrauchsfertig
PGZ5905NC	N	No Template Control	1 ×	450 µl	weiß, gebrauchsfertig
PGZ5905PC	P	Positive Control	1 ×	200 µl	blau, gebrauchsfertig

5. Reagenzien und ihre Lagerung

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

Tab. 2: Lagerungsbedingungen und -hinweise

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

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

6.1 Reagenzien

Folgende Reagenzien werden für die Durchführung des RIDA®GENE RSV & hMPV Tests benötigt:

Reagenzien
PCR-Wasser (Nuklease-frei)

6.2 Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Durchführung des RIDA®GENE RSV & hMPV Tests benötigt:

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

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

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro*-Diagnostik.

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

Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

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

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

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

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

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

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

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

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

Gefahrstoffangabe gemäß Kennzeichnungspflicht. Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS).

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

Der Kurzbericht über Sicherheit und Leistung (SSP) für dieses Produkt ist nach dem Start der Europäischen Datenbank für Medizinprodukte / EUDAMED unter <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> verfügbar. Suchen Sie nach dem Produkt in der Datenbank mit der UDI-DI, welche sich auf der Außenverpackung des Produktes befindet.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 RNA-Präparation aus Nasen- und Rachenabstrichen & BAL

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

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

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

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

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

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

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

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

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	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 PCR-Mix

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

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

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

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

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

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

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

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 Universal real-time PCR-Profil

Zur Harmonisierung der RIDA®GENE Assays wurde der RIDA®GENE RSV & hMPV Assay im Universalprofil verifiziert. Das bietet die Möglichkeit DNA und RNA Assays miteinander zu kombinieren. Daher ist im Universalprofil eine reverse Transkription vorangestellt.

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

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

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

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 6: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480 II	RSV	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	533/580	
	hMPV	618/660	

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

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

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

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

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * 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 nicht in dem angegebenen Ct-Bereich liegt, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

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

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

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

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

11. Interpretation der Ergebnisse

Derzeit gibt es keine internationale anerkannte Referenzmethode oder Referenzmaterial für die Standardisierung. Die Kontrollmaterialien sind auf die R-Biopharm AG internen Standards, basierend auf spezifischen RNA-Amplifikaten, metrologisch rückführbar.

Für weitere Informationen zur metrologischen Rückführbarkeit kontaktieren sie die R-Biopharm AG.

Entnehmen sie bitte die eingestellten Werte und Schwankungen sowie weitere Details dem beigefügten Analysezertifikat (Certificate of analysis, CoA).

Die Datenauswertung am LightCycler® 480 II erfolgt mittels Fit-Point-Methode. Signale größer als der Threshold werden als positive Ergebnisse gewertet.

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze (LoD-95 %) (Kap. 13.1.1) wurde der Threshold wie folgt gesetzt:

Nachweis	Matrix	Höhe Threshold (% Gesamtfluoreszenz)
RSV A	BAL	4,9 %
	Nasen-/Rachenabstrich	6,5 %
RSV B	BAL	3,5 %
	Nasen-/Rachenabstrich	6,0 %
hMPV A1	BAL	7,9 %
	Nasen-/Rachenabstrich	7,0 %
hMPV A2	BAL	9,9 %
	Nasen-/Rachenabstrich	10,9 %

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 8.

Tab. 8: Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von			
RSV	hMPV	ICR	Ergebnis
positiv	negativ	positiv/ negativ	RSV nachweisbar
negativ	positiv	positiv/ negativ	hMPV nachweisbar
positiv	positiv	positiv/ negativ	RSV und hMPV nachweisbar
negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	Ungültig

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

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

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

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

12. Grenzen der Methode

1. Der RIDA®GENE RSV & hMPV Test weist respiratorische Syncytial Virus (A/B) und humane Metapneumovirus (A/B) RNA aus unbehandelten humanen Nasen-/ Rachenabstrichen und BAL nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des ermittelten Ct-Werts und dem Auftreten schwerer klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem vollständigen klinischen Bild zu interpretieren.
2. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
3. Dieser Test ist nur für Nasen-/ Rachenabstrichen und BAL validiert.
4. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
5. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro*-diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter der Nachweisgrenze (LoD 95 %) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE RSV & hMPV zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
8. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (RSV (F-Gen) und hMPV (F-Glycoprotein)) vorhanden sind.
9. Die Substanzen Dihydrocodein und Azithromycin können bereits in geringen Mengen interferierende Eigenschaften aufweisen. Paracodin interferiert ab einer Konzentration von 3,0 % [v/v], Azithromycin-rathiopharm interferiert ab einer Konzentration von 25,2 mg/ ml
10. Dieser Assay sollte gemäß der GLP-Verordnung (Gute Laborpraxis) durchgeführt werden. Der Anwender muss bei der Durchführung des Tests die Anweisungen des Herstellers genau befolgen.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Leistungsmerkmale

13.1.1 Nachweisgrenze (LoD 95 %)

Zur Ermittlung des LoDs wurde pro Target und Matrix jeweils eine positive Kontrollprobe (negative BAL oder negativer Nasen-/Rachenabstrich, gespiked) in fünf Verdünnungsstufen (in 0,25 log-Stufen) mit 20 Replikaten pro Stufe mit einer Lot gemessen. Darauffolgend wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Anschließend wurde die Bestätigung des berechneten LoD mit 20 Replikaten pro Target und Matrix an der berechneten Verdünnungsstufe / Konzentration durchgeführt.

Für die Testung wurden folgende Stämme verwendet:

RSV-A 2006 Isolate, ZeptoMetrix, #0810040ACF

RSV-B Strain: CH93(18)-18, ZeptoMetrix, #0810040CF

hMPV-16 Type A1, Strain: IA10-2003, ZeptoMetrix, #0810161CF

hMPV-8 Type B2, Strain: Peru6-2003, ZeptoMetrix, #0810159CF

Für den Nachweis von RSV- und hMPV-RNA mithilfe des RIDA®GENE RSV & hMPV Assays, dem MagNA Pure 96 Instrument und dem Light Cycler® 480 II konnten die in Tabelle 9 dargestellten Nachweisgrenzen („Limit of detection“, LoD) bestimmt werden.

Tab. 9: Ergebnisse der Nachweisgrenzen des RIDA®GENE RSV & hMPV Tests für die Parameter RSV und hMPV.

	RSV A	RSV B	hMPV A1	hMPV B2
LoD BAL	190,11 TCID ₅₀ */ml	4,15 TCID ₅₀ */ml	1,01 TCID ₅₀ */ml	0,63 TCID ₅₀ */ml
LoD Nasen- /Rachenabstrich	193,20 TCID ₅₀ */ml	6,89 TCID ₅₀ */ml	5,70 TCID ₅₀ */ml	5,22 TCID ₅₀ */ml

*TCID: Tissue Culture Infectious Dose

Der LoD für den Parameter RSV A in BAL wurde bei 190,11 TCID₅₀*/ml bestimmt.

Der LoD für den Parameter RSV A in Nasen / Rachenabstrich wurde bei 193,20 TCID₅₀*/ml bestimmt.

Der LoD für den Parameter RSV B in BAL wurde bei 4,15 TCID₅₀*/ml bestimmt.

Der LoD für den Parameter RSV B in Nasen / Rachenabstrich wurde bei 6,89 TCID₅₀*/ml bestimmt.

Der LoD für den Parameter hMPV A1 in BAL wurde bei 1,01 TCID₅₀*/ml bestimmt.

Der LoD für den Parameter hMPV A1 in Nasen / Rachenabstrich wurde bei 5,70 TCID₅₀*/ml bestimmt.

Der LoD für den Parameter hMPV B2 in BAL wurde bei 0,63 TCID₅₀*/ml bestimmt.

Der LoD für den Parameter hMPV A1 in Nasen / Rachenabstrich wurde bei 5,22 TCID₅₀*/ml bestimmt.

13.1.2 Gerätenachweisgrenze

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

Die Gerätenachweisgrenze liegt somit bei 50 Kopien/Reaktion.

13.1.3 Analytische Spezifität

Interferierende Substanzen

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

Substanzen, die möglicherweise die Testergebnisse signifikant beeinflussen könnten, wurden zunächst in einem Interferenz-Screen untersucht. Dabei wurden verschiedene Substanzen, die entweder als Rückstand der Extraktion, aufgrund verbreiteter Anwendung bei Atemwegsinfektionen (verschiedene apotheken- oder verschreibungspflichtige Medikamente) oder verbreitetem Vorkommen in den entsprechenden Kontrollproben z.B. Muzine, die sich auf der Oberfläche von Schleimhäuten befinden oder Blut) vorhanden sein könnten, zunächst in hohen Konzentrationen (dreifache Tagesdosis oder Simulation des „worst case“) überprüft. Wurde in diesem Interferenz-Screen bei einer untersuchten Substanz eine mögliche Interferenz festgestellt, wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Konzentration der betreffenden Substanz und der Interferenz hergestellt. Für die in Tabelle 10 aufgeführten Substanzen wurden keine Interferenzen festgestellt.

Tab. 10: Potentiell interferierende Substanzen

Potentiell interferierende Substanz	Konzentration
Mucosolvan (Ambroxolhydrochlorid)*	10 % [v/v]
Amoxicillin	1 mg/ml
Humanblut	2 % [v/v]
Mucine	60 µg/ml
Nasivin 0,05 % (Oxymetazolin)**	10 % [v/v]
Natriumchlorid	10 % [v/v]
Oseltamivirphosphat	25 mg/ml
ratioAllerg 50 µg (Beclomethasondipropionat)**	10 % [v/v]
Tobramycin	4 µg/ml

* Substanz wird nur für die Matrix BAL getestet

** Substanzen werden nur für die Matrix Nasen-/Rachenabstrich getestet

Für die Substanzen Paracodin (3 %) und Azithromycin-rathiofarm (25,2 mg/ml) wurden inhibitorische Effekte beobachtet (siehe Grenzen der Methode).

Kreuzreaktivität

Verschiedene Organismen (Bakterien, Viren, Pilze), die häufig in der Matrix BAL oder in Nasen-/Rachenabstrichen vorkommen können, wurden untersucht. Die Auswahl der zu untersuchenden Mikroorganismen für diesen Assay beruhte entweder darauf, dass diese natürlicherweise in den beiden Matrices zu finden sind oder als respiratorische Erreger entsprechende Symptome hervorrufen. Für Analysen wurden Bakterien- (zwischen 10^6 und 10^9 CFU*/ml), Pilz- oder Viruskulturen, infektiöse Zellkulturüberstände von Viren, Bakterien oder Pilzen, Isolate, LGC- oder NIBSC-Standards der jeweiligen Organismen verwendet.

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

Tab. 11: Potentiell kreuzreaktive Organismen

Organismus	Testergebnis	
	RSV	hMPV
<i>Acinetobacter baumannii</i> strain 5377	negativ	negativ
Adenovirus 1, Human, strain Adenoid 71	negativ	negativ
Adenovirus 4	negativ	negativ
Adenovirus 7, Human, strain Gomen	negativ	negativ
Adenovirus 31	negativ	negativ
Adenovirus 34	negativ	negativ
Adenovirus 37	negativ	negativ
<i>Aspergillus terreus</i>	negativ	negativ
<i>Bordetella parapertussis</i> strain 12822	negativ	negativ
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	negativ	negativ
<i>Candida albicans</i>	negativ	negativ
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	negativ	negativ
<i>Chlamydia psittaci</i>	negativ	negativ
<i>Clostridium perfringens</i>	negativ	negativ
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	negativ	negativ
Echovirus 11	negativ	negativ
Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	negativ	negativ
<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	negativ	negativ
<i>Escherichia coli</i> (O6)	negativ	negativ
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	negativ	negativ
<i>Enterobacter cloacae</i>	negativ	negativ
Enterovirus Typ 71, strain 2003 Isolate	negativ	negativ
<i>Haemophilus influenzae</i>	negativ	negativ
Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	negativ	negativ
Herpes simplex virus 2 strain MS	negativ	negativ
Human Coronavirus 229E	negativ	negativ
Human Coronavirus OC43	negativ	negativ
Human Coxsackie A2, strain Fleetwood	negativ	negativ
Human Coxsackie B4	negativ	negativ
Human Cytomegalovirus	negativ	negativ
Human Parainfluenza Virus 1 strain C35	negativ	negativ
Human Parainfluenza Virus 2 strain Greer	negativ	negativ
Human Parainfluenza Virus seotype 3	negativ	negativ
Human Parainfluenza Virus 4a Strain M-25	negativ	negativ

Human Rhinovirus Genogruppe A	negativ	negativ
Influenza A H1N1 Brisbane/59/07	negativ	negativ
Influenza A H3N2 Texas/50/12	negativ	negativ
Influenza B/Washington/02/2019	negativ	negativ
Influenza B/Colorado/6/2017	negativ	negativ
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MGH78578	negativ	negativ
<i>Lactobacillus plantarum</i>	negativ	negativ
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>Pneumophila</i>	negativ	negativ
<i>Moraxella catarrhalis</i>	negativ	negativ
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Strain FH of Eaton Agent	negativ	negativ
<i>Neisseria meningitidis</i> Strain FAM18	negativ	negativ
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	negativ	negativ
<i>Proteus vulgaris</i>	negativ	negativ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	negativ
<i>Serratia marcescens</i>	negativ	negativ
<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain NCTC 7465	negativ	negativ
<i>Streptococcus pyogenes</i>	negativ	negativ
<i>Streptococcus salivarius</i>	negativ	negativ
<i>Staphylococcus aureus</i>	negativ	negativ
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativ	negativ

*CFU: Colony Forming Units

13.1.4 Präzision

Die Präzision des RIDA®GENE RSV & hMPV real-time RT-PCR Tests wurde für folgende Betrachtungsebenen ermittelt.

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

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

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

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

Der höchste erhaltene Variationskoeffizient der jeweiligen Messungen mit dem RIDA®GENE RSV & hMPV real-time RT-PCR Test auf dem LightCycler® 480 II lag bei 1,93 %.

Tab. 12: Ergebnisse der Präzision des RIDA®GENE RSV & hMPV Tests für RSV.

Ct-Mittelwert / VK	Intra-Assay			Inter-Assay			Inter-Lot
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	34,3	34,6	34,6	33,6	33,6	33,7
	VK (%)	1,72 %	1,31 %	1,27 %	1,47 %	1,63 %	1,88 %
3	Ct	32,1	32,6	32,6	31,2	31,1	31,6
	VK (%)	0,94 %	1,06 %	0,93 %	1,72 %	1,62 %	1,86 %
4	Ct	25,9	25,9	26,1	24,6	24,5	25,0
	VK (%)	0,87 %	0,67 %	0,68 %	1,35 %	1,50 %	1,84 %
5	Ct	22,4	22,7	22,8	21,3	21,3	21,7
	VK (%)	0,84 %	0,73 %	0,66 %	1,25 %	1,84 %	1,62 %

Tab. 13: Ergebnisse der Präzision des RIDA®GENE RSV & hMPV Tests für hMPV.

Ct- Mittelwert / VK		Intra-Assay			Inter-Assay			Inter- Lot
		Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	33,6	33,5	33,7	32,9	33,0	32,8	32,9
	VK (%)	0,80 %	1,17 %	0,83 %	1,44 %	1,43 %	1,64 %	1,54 %
3	Ct	31,6	31,8	31,7	30,6	30,6	30,8	30,7
	VK (%)	0,80 %	0,50 %	0,80 %	1,40 %	1,11 %	1,27 %	1,29 %
4	Ct	25,1	25,4	25,4	24,1	24,1	24,4	24,2
	VK (%)	0,97 %	0,72 %	0,69 %	1,92 %	1,80 %	1,80 %	1,91 %
5	Ct	21,8	21,9	21,8	20,9	20,8	20,9	20,9
	VK (%)	0,83 %	0,94 %	0,79 %	1,27 %	1,65 %	1,63 %	1,53 %

13.1.5 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des RIDA®GENE RSV & hMPV real-time RT-PCR Tests wurde mit RSV Stämmen und hMPV Subtypen untersucht (s. Tab. 14). Die getesteten RSV Stämme und hMPV Subtypen wurden mit dem RIDA®GENE RSV & hMPV real-time RT-PCR Test nachgewiesen.

Tab. 14: Analytische Reaktivitätstestung

Stamm	Konzentration	Ergebnis*	
		RSV	hMPV
hMPV 5 Typ B1	10 ^{-1,70} U/ml	-	+
hMPV 8 Typ B2	10 ^{2,10} U/ml	-	+
hMPV 16 Typ A1	10 ^{0,82} U/ml	-	+
hMPV 20 Typ A2	10 ^{0,34} U/ml	-	+
RSV A (Isolate:2006 Isolate)	10 ^{2,53} U/ml	+	-
RSV A strain Long	3,74 x 10 ¹ PFU**/ml	+	-
RSV B (strain:CH93(18)-18)	10 ^{0,82} U/ml	+	-
RSV B strain 9320	8,9 x 10 ⁰ TCID ₅₀ /ml	+	-

*+ = positiv (mindestens 2 von 3 Replikaten positiv)
- = negative










** Plaque Forming Units

14. Versionsübersicht





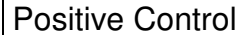
Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2015-11-16	Freigabeversion
2021-08-24	Generelle Überarbeitung: 1. Zweckbestimmung 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests 3. Testprinzip 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 7. Vorsichtsmaßnahmen 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 11. Interpretation der Ergebnisse 12. Grenzen der Methode 13. Leistungsmerkmale

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

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

16. Literatur

1. Harun A, Beyza E. Viral and Atypical Bacterial Respiratory Infections in a University Teaching Hospital: Japanese Journal of Infectious Diseases. 2019; 72(5): 318–322.
2. Luo H-J, Huang X-B, Zhong H-L, Ye C-X, Tan X, Zhou K, Yuan L, Zhang S-F, Zhu X, Lin C-J, Wang W-J, Xu L, Cao K-Y. Epidemiological characteristics and phylogenetic analysis of human respiratory syncytial virus in patients with respiratory infections during 2011-2016 in southern China. International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases. 2020; 90: 5–17.
3. Park E, Park PH, Huh JW, Yun HJ, Lee HK, Yoon M., Lee S, Ko G. Molecular and clinical characterization of human respiratory syncytial virus in South Korea between 2009 and 2014. Epidemiology and Infection, 2017; 145(15): 3226–3242.
4. Fillatre A, François C, Segard C, Duverlie G, Hecquet D, Pannier C, Roussel C, Zawadzki P, Brochot E, Castelain S. Epidemiology and seasonality of acute

- respiratory infections in hospitalized children over four consecutive years (2012-2016). *Journal of Clinical Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2018; 102: 27–31.
5. Owor BE, Masankwa GN, Mwangi LC, Njeru RW, Agoti CN, Nokes DJ. Human metapneumovirus epidemiological and evolutionary patterns in Coastal Kenya, 2007-11. *BMC Infectious Diseases*. 2016; 16: 301.
 6. Vieira SE, Thomazelli LM, de Paulis M, Ferronato AE, Oliveira DB, Martinez MB, Durigon EL. Infections Caused by HRSV A ON1 Are Predominant among Hospitalized Infants with Bronchiolitis in São Paulo City. *BioMed Research International*. 2017; 3459785.
 7. Nguyen VH, Dubot-Pérès A, Russell FM, Dance DAB, Vilivong K, Phommachan S, Syladeth C, Lai J, Lim R, Morpeth M, Mayxay M, Newton PN, Richet H, De Lamballerie X. Acute respiratory infections in hospitalized children in Vientiane, Lao PDR - the importance of Respiratory Syncytial Virus. *Scientific Reports*. 2017; 7(1): 9318.
 8. Soudani N, Caniza MA, Assaf-Casals A, Shaker R, Lteif M, Su Y, Tang L, Akel I, Muwakkat S, Chmairie A, Homsy M, Dbaibo G, Zaraket H. Prevalence and characteristics of acute respiratory virus infections in pediatric cancer patients. *Journal of Medical Virology*. 2019; 91(7): 1191–1201.
 9. Rodriguez PE, Frutos MC, Adamo MP, Cuffini C, Cámara JA, Paglini MG, Moreno L, Cámara A. Human Metapneumovirus: Epidemiology and genotype diversity in children and adult patients with respiratory infection in Córdoba, Argentina. *PloS One*. 2020; 15(12): e0244093.
 10. Evelyn O, Jaime FS, David M, Lorena A, Jenifer A, Oscar G. Prevalence, clinical outcomes and rainfall association of acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in Bogotá, Colombia. *BMC Pediatrics*. 2019; 19(1): 345.
 11. Halaji M, Hashempour T, Moayedi J, Pouladfar GR, Khansarinejad B, Khashei R, Moattari A, Musavi Z, Ghassabi F, Pirbonyeh N. Viral etiology of acute respiratory infections in children in Southern Iran. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2019; 52: e20180249.
 12. Al-Romaihi HE, Smatti MK, Ganesan N, Nadeem S, Farag E, Coyle PV, Nader, JD, Al-Khatib HA, Elmagboul EB, Al Dhahry S, Al-Marri SA, Al Thani AA, Al Khal A, Al Maslamani MA, Yassine HM. Epidemiology of respiratory infections among adults in Qatar (2012-2017). *PloS One*. 2019; 14(6): e0218097.