

RIDA® GENE RSV & hMPV

REF PG5905



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

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



1. Campo di applicazione

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

Il test RIDA®GENE RSV & hMPV è concepito per supportare la diagnosi delle infezioni virali (RSV e hMPV) in pazienti con sintomi di infezione respiratoria in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono l'infezione da RSV o hMPV e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi.

Il prodotto è destinato all'uso professionale.

2. Sintesi e spiegazione del test

Il virus respiratorio sinciziale umano (RSV) è considerato uno dei patogeni più potenti nelle infezioni acute del tratto respiratorio inferiore, come l'infiammazione polmonare e la bronchiolite^(1,2,3). È stata riscontrata un'alta incidenza di infezioni da RSV soprattutto nei bambini di meno di 6 mesi^(4,5). L'RSV è associato a un'elevata morbilità e mortalità non solo nei bambini ma anche negli anziani, nei pazienti con malattie preesistenti e negli adulti immunocompromessi^(2,6). L'RSV è un RNA-virus non segmentato e rivestito che appartiene alla famiglia Pneumoviridae^(2,3). Il genoma virale, una molecola di RNA a filamento singolo (ssRNA), codifica per 11 proteine⁽⁶⁾. Data l'antigenicità della sua proteina G, il ceppo è diviso in due gruppi antigenici: RSV A e B. Attualmente, sono conosciuti 14 genotipi di RSV A e 25 genotipi di RSV B^(2,6). Diversi studi sono giunti in modo unanime alla conclusione che l'RSV è il virus respiratorio più comunemente rivelato^(2,6,7). In particolare, i focolai epidemici di RSV si verificano durante l'inverno da novembre a marzo. Il picco delle infezioni è principalmente in gennaio^(1,3,8). L'RSV si manifesta generalmente insieme ad altri virus respiratori^(2,3).

Il metapneumovirus umano (hMPV) è stato isolato per la prima volta nel 2001 da campioni del tratto respiratorio di bambini sotto i 5 anni⁽⁹⁾. Il metapneumovirus umano è una particella virale rivestita che appartiene alla famiglia Pneumoviridae come l'RSV. Il genoma virale è un RNA a filamento singolo (ssRNA) che consiste di 8 geni. Il ceppo hMPV è stato diviso in due diversi genotipi, A e B. Ogni gruppo è anche ulteriormente diviso in due sottogenotipi 1 e 2 (A1, A2, B1, B2) che si basano sulle differenze genetiche delle proteine di superficie F e G. Entrambi i genotipi possono coesistere e circolare simultaneamente nello stesso periodo, mentre il gruppo A è generalmente il genotipo dominante. Tuttavia, la distribuzione dipende dalla stagionalità e dalla regione^(3,5,9,10). Le infezioni da hMPV possono verificarsi durante tutto l'anno, ma l'infezione di solito raggiunge un picco alla fine della stagione invernale. Una chiara stagionalità è evidente, specialmente con alti tassi di infezione

in gennaio^(9,11). Sono state descritte diverse volte confezioni con altri patogeni del tratto respiratorio, come ad es. il virus respiratorio sinciziale (RSV)⁽⁹⁾.

Secondo gli studi, RSV e hMPV, oltre all'influenza, sono i patogeni virali predominanti durante la stagione invernale e quindi mostrano una stagionalità costante⁽¹²⁾. I sintomi più comuni delle infezioni acute del tratto respiratorio sono febbre, tosse, faringodinia, cefalea, tachipnea, rantoli, stridore, respiro sibilante o affannoso o sintomi del tratto respiratorio superiore (rinorrea e starnuti), e affaticamento^(9,11).

3. Principio del test

Il test RIDA[®]GENE RSV & hMPV è un test RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dell'RNA del virus respiratorio sinciziale (A/B) e del metapneumovirus umano (A/B) da tamponi nasali/faringei e da BAL.

Dopo l'isolamento del DNA, vengono amplificati i frammenti del gene specifico di RSV (gene F) e hMPV (glicoproteina F) (se presente). 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 RSV & hMPV contiene un **Internal Control RNA** (ICR) per verificare la preparazione del campione e/o la potenziale inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

I reagenti nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni.

Tabella 1: Contenuto della confezione

RIF	Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
PGZ5905RM	1	Reaction Mix	2 ×	1050 µl	giallo, pronto per l'uso
PGZ5905EM	2	Enzyme Mix	1 ×	80 µl	rosso, pronto per l'uso
PGZ5905IC	R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µl	marrone, pronto per l'uso
PGZ5905NC	N	No Template Control	1 ×	450 µl	bianco, pronto per l'uso
PGZ5905PC	P	Positive Control	1 ×	200 µl	blu, pronto per l'uso

5. Istruzioni di conservazione

- Seguire le linee guida per la manipolazione contenute nella Tabella 2 e riporre il kit immediatamente dopo l'uso attenendosi alle informazioni specificate.
- Tutti i reagenti devono essere conservati lontano dalla luce a una temperatura di -20 °C, e prima dell'apertura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati con cura prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2 - 8 °C).
- Il congelamento/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 (2 - 8 °C).

Tabella 2: Condizioni di conservazione e informazioni

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

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

6.1 Contenuto della confezione

I seguenti reagenti sono necessari per eseguire il test RIDA[®]GENE RSV & hMPV:

Reagenti
Acqua per PCR (priva di nucleasi)

6.2 Attrezzatura di laboratorio

Per eseguire il test RIDA[®]GENE RSV & hMPV occorre la seguente attrezzatura:

Attrezzatura
Piattaforma di estrazione: strumento MagNA Pure 96 (Roche)
Strumento per la PCR real-time: LightCycler [®] 480 II (Roche)
RIDA [®] GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm)
Materiali di consumo per PCR real-time (piastre [profilo basso, pozzetti bianchi, telaio trasparente], cuvette di reazione; pellicole)
Centrifuga con rotore per piastre
Agitatore a vortice
Pipette (0,5-20 µl, 20-200 µl, 100-1.000 µl)
Puntali per pipette con filtri
Guanti monouso senza talco

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

7. Avvertenze e misure precauzionali

Solo per la diagnostica *in vitro*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8. Raccolta e conservazione dei campioni

8.1 Preparazione dell'RNA da tamponi nasali e faringei e da BAL

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

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

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

Quando si deve utilizzare l' **Internal Control RNA** come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione per l'amplificazione, durante l'estrazione devono essere utilizzati 20 µl di **Internal Control RNA**. Se possibile, si consiglia di aggiungere l'Internal Control RNA alla cartuccia del campione prima di aggiungere il campione. Raccomandiamo di pipettare 1 µl di **Internal Control RNA** per reazione alla PCR Mix sia per il controllo negativo, sia per il controllo positivo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

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

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

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

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

Miscelare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

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

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

Miscelare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

9.2 Preparazione della PCR Mix

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

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

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

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

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

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

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

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo per PCR real-time universale

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

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

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

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

9.4 impostazione del canale di rivelazione

Tabella 6: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

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

10. Controllo qualità – Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

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

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

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

Campione	Risultato	Ct ICR	Gene Ct target
Controllo positivo	Positivo	N/A *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct >20	0

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

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

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

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

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

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

11. Interpretazione del risultato

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

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

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

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

Per determinare il limite di rivelazione (LoD 95 %) (sezione 13.1.1), la soglia è stata impostata come segue:

Rivelazione	Matrice	Soglia elevata (% di fluorescenza totale)
RSV A	BAL	4,9 %
	Tampone nasale/faringeo	6,5 %
RSV B	BAL	3,5 %
	Tampone nasale/faringeo	6,0 %
hMPV A1	BAL	7,9 %
	Tampone nasale/faringeo	7,0 %
hMPV A2	BAL	9,9 %
	Tampone nasale/faringeo	10,9 %

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 8.

Tabella 8: Interpretazione del risultato

Rivelazione di			
RSV	hMPV	ICR	Risultato
positivo	negativo	positivo/ negativo	RSV rivelabile
negativo	positivo	positivo/ negativo	hMPV rivelabile
positivo	positivo	positivo/ negativo	RSV e hMPV rivelabili
negativo	negativo	positivo	Gene target non rivelabile
negativo	negativo	negativo	Non valido

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

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

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

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

12. Limiti del metodo

1. Il test RIDA[®]GENE RSV & hMPV rivela l'RNA del virus respiratorio sinciziale (A/B) e del metapneumovirus umano (A/B) da tamponi nasali/faringei umani e da BAL non trattati. Pertanto non è possibile dedurre una correlazione tra il livello di un determinato valore Ct e la presenza di sintomi clinici gravi. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati in combinazione con la sintomatologia clinica nel suo complesso.
2. La diagnosi non dovrebbe basarsi solo sul risultato del test biologico molecolare, ma dovrebbe sempre tenere conto dell'anamnesi e dei sintomi del paziente.
3. Questo test è convalidato solo per tamponi nasali/faringei e da BAL.
4. Procedure inadeguate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento o un carico di agenti patogeni al di sotto della sensibilità analitica del test possono produrre falsi negativi.
5. La presenza di inibitori della PCR può portare a risultati falsi negativi o non validi.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, possono essere rivelate concentrazioni estremamente basse delle sequenze target, sotto il limite di rivelazione (LoD 95 %), ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.
7. Eventuali mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione di varianti nuove o sconosciute, e possono produrre risultati falsi negativi utilizzando RIDA[®]GENE RSV & hMPV.
8. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un risultato positivo indica che sono presenti i geni target (RSV (gene F) e hMPV (glicoproteina F)).
9. Le sostanze diidrocodina e azitromicina possono avere proprietà interferenti, anche in piccole quantità. La paracodina interferisce a partire da una concentrazione del 3,0 % [v/v]; l'azitromicina interferisce a partire da una concentrazione di 25,2 mg/ml.
10. Questo test deve essere eseguito in conformità con il regolamento sulle buone pratiche di laboratorio (BPL). Durante l'esecuzione del test, gli operatori devono seguire esattamente le istruzioni del produttore.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Prestazioni e caratteristiche analitiche

13.1.1 Limite di rivelazione (LoD 95 %)

Un campione di controllo positivo (tampone da BAL o nasale/faringeo negativo, arricchito) è stato misurato in cinque fasi di diluizione (in fasi di 0,25-log) per ogni target e matrice con 20 replicati per fase in un lotto per determinare il LoD. Ha fatto seguito un'analisi probit. Successivamente, il LoD calcolato è stato confermato con 20 replicati per target e matrice per la fase/concentrazione di diluizione calcolata. Per i test sono stati utilizzati i seguenti ceppi:

RSV A 2006 isolato, ZeptoMetrix, #0810040ACF

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

hMPV -16 tipo A1, ceppo: IA10-2003, ZeptoMetrix, #0810161CF

hMPV-8 tipo B2, ceppo: Peru6-2003, ZeptoMetrix, #0810159CF

Per la rivelazione dell'RNA di RSV e hMPV con l'ausilio del test RIDA®GENE RSV & hMPV, lo strumento MAGNA Pure 96 e il LightCycler® 480 II, sono stati determinati i limiti di rivelazione (LoD) indicati nella Tabella 9.

Tabella 9: Risultati dei limiti di rivelazione del test RIDA®GENE RSV & hMPV per i parametri RSV e 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 tampone nasale/faringeo	193,20 TCID ₅₀ */ml	6,89 TCID ₅₀ */ml	5,70 TCID ₅₀ */ml	5,22 TCID ₅₀ */ml

*TCID: Dose infettiva da coltura tissutale

Il LoD per il parametro RSV A nel BAL è stato determinato a 190,11 TCID₅₀*/ml.

Il LoD per il parametro RSV A nel tampone nasale/faringeo è stato determinato a 193,20 TCID₅₀*/ml.

Il LoD per il parametro RSV B nel BAL è stato determinato a 4,15 TCID₅₀*/ml.

Il LoD per il parametro RSV B nel tampone nasale/faringeo è stato determinato a 6,89 TCID₅₀*/ml.

Il LoD per il parametro hMPV A1 nel BAL è stato determinato a 1,01 TCID₅₀*/ml.

Il LoD per il parametro hMPV A1 nel tampone nasale/faringeo è stato determinato a 5,70 TCID₅₀*/ml.

Il LoD per il parametro hMPV B2 nel BAL è stato determinato a 0,63 TCID₅₀*/ml.

Il LoD per il parametro hMPV A1 nel tampone nasale/faringeo è stato determinato a 5,22 TCID₅₀*/ml.

13.1.2 Limite di rivelazione dello strumento

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

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

13.1.3 Specificità analitica

Sostanze interferenti

La presenza di inibitori della RT-PCR e sostanze interferenti può portare a risultati falsi negativi o non validi. Quindi, sono stati studiati gli effetti di diverse sostanze che potrebbero essere presenti in quanto ampiamente utilizzate nelle infezioni del tratto respiratorio o a causa della loro presenza diffusa nei campioni corrispondenti.

Le sostanze che potrebbero influenzare significativamente i risultati del test sono state prima esaminate in un'analisi di interferenza. Inizialmente sono state esaminate varie sostanze che potrebbero essere presenti come residui dell'estrazione, a causa dell'uso diffuso nelle infezioni respiratorie (vari farmaci da banco o soggetti a prescrizione), oppure a causa della presenza diffusa nei campioni di controllo corrispondenti (ad es., mucine sulla superficie delle mucose o sangue), in concentrazioni elevate (tre volte la dose giornaliera o la simulazione del "caso peggiore"). Se dall'analisi di interferenza risultava una potenziale interferenza con una delle sostanze esaminate, è stata stabilita una relazione dose-effetto tra la concentrazione della sostanza in questione e l'interferenza.

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

Tabella 10: Sostanze potenzialmente interferenti

Sostanza potenzialmente interferente	Concentrazione
Mucosolvan (ambroxolo cloridrato)*	10 % [v/v]
Amoxicillina	1 mg/ml
Sangue umano	2 % [v/v]
Mucine	60 µg/ml
Nasivin 0,05% (ossimetazolina)**	10 % [v/v]
Cloruro di sodio	10 % [v/v]
Oseltamivir fosfato	25 mg/ml
ratioAllerg 50 µg (beclometasone dipropionato)**	10 % [v/v]
Tobramicina	4 µg/ml

*Sostanza testata solo per la matrice BAL

**Sostanze testate solo per il tampone nasale/faringeo della matrice

Sono stati osservati effetti inibitori per le sostanze paracodina (3 %) e azitromicina-ratiofarm (25,2 mg/ml) (vedere i limiti del metodo).

Reattività incrociata

Sono stati studiati vari organismi (batteri, virus, funghi) che si trovano comunemente nella matrice BAL o nei tamponi nasali/faringei. I microrganismi da studiare per questo test sono stati scelti perché o si trovano naturalmente in entrambe le matrici, o causano sintomi corrispondenti come patogeni respiratori. Per le analisi sono state utilizzate colture batteriche (tra 10^6 e 10^9 UFC*/ml), fungine o virali; surnatanti di colture cellulari infettive di virus, batteri o funghi; isolati; o standard LGC o NIBSC del particolare organismo.

RIDA®GENE RSV & hMPV RT-PCR real-time multiplex è specifico per i virus RSV e hMPV. Non sono state rivelate reattività incrociate con le seguenti specie (Tabella 11):

Tabella 11: Organismi potenzialmente cross-reattivi

Organismo	Risultato del test	
	RSV	hMPV
<i>Acinetobacter baumannii</i> , ceppo 5377	negativo	negativo
Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	negativo	negativo
Adenovirus 4	negativo	negativo
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	negativo	negativo
Adenovirus 31	negativo	negativo
Adenovirus 34	negativo	negativo
Adenovirus 37	negativo	negativo
<i>Aspergillus terreus</i>	negativo	negativo
<i>Bordetella parapertussis</i> , ceppo 12822	negativo	negativo
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	negativo	negativo
<i>Candida albicans</i>	negativo	negativo
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	negativo	negativo
<i>Chlamydia psittaci</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	negativo	negativo
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	negativo	negativo
Echovirus Tipo 11	negativo	negativo
Virus di Epstein-Barr, ceppo B95-8	negativo	negativo
<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	negativo	negativo
<i>Escherichia coli</i> (O6)	negativo	negativo
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	negativo	negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	negativo	negativo
Enterovirus tipo 71, ceppo 2003 isolato	negativo	negativo
<i>Haemophilus influenzae</i>	negativo	negativo
Virus dell'herpes simplex 1, ceppo McIntyre	negativo	negativo
Virus dell'herpes simplex 2, ceppo MS	negativo	negativo
Coronavirus 229E umano	negativo	negativo
Coronavirus OC43 umano	negativo	negativo
Coxsackievirus umano A2, ceppo Fleetwood	negativo	negativo
Coxsackie B4 umano	negativo	negativo
Cytomegalovirus umano	negativo	negativo
Virus parainfluenzale umano 1, ceppo C35	negativo	negativo
Virus parainfluenzale umano 2, ceppo Greer	negativo	negativo
Virus parainfluenzale umano, sierotipo 3	negativo	negativo
Virus parainfluenzale umano 4a, ceppo M-25	negativo	negativo

Rhinovirus umano genograppo A	negativo	negativo
Influenza A H1N1 Brisbane/59/07	negativo	negativo
Influenza A H3N2 Texas/50/12	negativo	negativo
Influenza B/Washington/02/2019	negativo	negativo
Influenza B/Colorado/6/2017	negativo	negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ceppo MGH 78578	negativo	negativo
<i>Lactobacillus plantarum</i>	negativo	negativo
<i>Legionella pneumophila</i> sottosp. <i>Pneumophila</i>	negativo	negativo
<i>Moraxella catarrhalis</i>	negativo	negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , ceppo FH di agente Eaton	negativo	negativo
<i>Neisseria meningitidis</i> , ceppo FAM18	negativo	negativo
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	negativo	negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	negativo	negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	negativo
<i>Serratia marcescens</i>	negativo	negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , ceppo NCTC 7465	negativo	negativo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	negativo	negativo
<i>Streptococcus salivarius</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativo	negativo

*UFC: unità formanti colonie

13.1.4 Precisione

La precisione del test RT-PCR real-time RIDA®GENE RSV & hMPV è stata determinata per i seguenti livelli di considerazione.

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

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

Precisione inter-lotto: i test di precisione intra- e inter-test sono stati effettuati utilizzando tre diversi lotti.

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

Il massimo coefficiente di variazione ottenuto dalle misurazioni con il test RIDA®GENE RSV & hMPV RT-PCR real-time su LightCycler® 480 II è stato dell'1,93 %.

Tabella 12: Risultati della precisione del test RIDA®GENE RSV & hMPV per RSV.

Valore medio/ CV Ct	Intra-test			Inter-test			Inter-lotto	
	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1–3	
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
2	Ct	34,3	34,6	34,6	33,6	33,6	33,7	33,7
	CV (%)	1,72 %	1,31%	1,27 %	1,47 %	1,63 %	1,88 %	1,66 %
3	Ct	32,1	32,6	32,6	31,2	31,1	31,6	31,3
	CV (%)	0,94 %	1,06 %	0,93 %	1,72 %	1,62 %	1,86 %	1,85 %
4	Ct	25,9	25,9	26,1	24,6	24,5	25,0	24,7
	CV (%)	0,87 %	0,67 %	0,68 %	1,35 %	1,50 %	1,84 %	1,93 %
5	Ct	22,4	22,7	22,8	21,3	21,3	21,7	21,4
	CV (%)	0,84 %	0,73 %	0,66 %	1,25 %	1,84 %	1,62 %	1,85 %

Tabella 13: Risultati della precisione del test RIDA®GENE RSV & hMPV per hMPV.

Valore medio/ CV Ct		Intra-test			Inter-test			Inter-lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
2	Ct	33,6	33,5	33,7	32,9	33,0	32,8	32,9
	CV (%)	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
	CV (%)	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
	CV (%)	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
	CV (%)	0,83 %	0,94 %	0,79 %	1,27 %	1,65 %	1,63 %	1,53 %

13.1.5 Reattività analitica

La reattività del test RIDA®GENE RSV & hMPV RT-PCR real-time è stata studiata utilizzando ceppi RSV e sottotipi hMPV (Tabella 14). I ceppi testati di RSV e i sottotipi di hMPV sono stati rivelati dal test RIDA®GENE RSV & hMPV RT-PCR real-time.

Tabella 14: Test di reattività analitica

Ceppo	Concentrazione	Risultato*	
		RSV	hMPV
hMPV 5 tipo B1	10 ^{-1,70} U/ml	-	+
hMPV 8 tipo B2	10 ^{2,10} U/ml	-	+
hMPV 16 tipo A1	10 ^{0,82} U/ml	-	+
hMPV 20 tipo A2	10 ^{0,34} U/ml	-	+
RSV A (isolato: 2006)	10 ^{2,53} U/ml	+	-
RSV A, ceppo lungo	3,74 x 10 ¹ CFU**/ml	+	-
RSV B (ceppo:CH93(18)-18)	10 ^{0,82} U/ml	+	-
RSV B ceppo 9320	8,9 x 10 ⁰ TCID ₅₀ /ml	+	-

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

- = negativo










**Unità formanti placca

14. Cronologia delle versioni

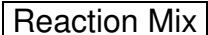


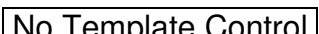
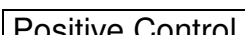
Numero della versione	Sezione e denominazione
2021-08-24	Versione di rilascio
2022-01-20	Revisione generale: 4.Contenuto della confezione

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Uso per la diagnostica in vitro
	Attenersi alle istruzioni per l'uso
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Fabbricante

Simboli specifici del test

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

16. Bibliografia

1. 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.