



RIDA® GENE Pediatric Viral Panel

REF PG4725



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 Pediatric Viral Panel Test, der auf dem LightCycler® 480 II real-time PCR Gerät durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und Differenzierung von Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus RNA, Bocavirus DNA und Adenovirus DNA aus unbehandelten humanen Nasen-/Rachenabstrichen von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer respiratorischen Infektion.

Der RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Test ist zur Unterstützung der Differentialdiagnose von Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus, Bocavirus und Adenovirus-Infektionen bei Patienten mit Symptomen einer respiratorischen Infektion in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen. Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus, Bocavirus und Adenovirus 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

Virusinfektionen der Atemwege sind eine der Hauptursachen für Krankenhauseinweisungen und Klinikbesuche bei Kindern und älteren Menschen⁽¹⁻⁶⁾. Neben den bekannten respiratorischen Viren wie Influenza und SARS-CoV-2 können Infektionen der Atemwege durch Adenoviren, Bocaviren, Enteroviren, Parechoviren und Rhinoviren hervorgerufen werden.

Humane Adenoviren (HAdV) gehören zur Familie der Adenoviridae und zur Gattung Mastadenovirus. Es sind Ikosaeder-förmige, 65-110 nm im Durchmesser, unbehüllte und doppelsträngige DNA-Viren. Sie werden in sieben Arten (A-G) eingeteilt, die etwa 67 Serotypen umfassen^(7,8).

Humane Bocaviren (HBoV) sind ikosaedrische, kleine und unbehüllte Parvoviren⁽⁹⁻¹¹⁾. Sie haben einen Durchmesser von etwa 18 nm bis 26 nm und besitzen eine einzelsträngige DNA mit einer Genomgröße von 4 kb bis 6 kb (plus terminale Sequenzen von 32-52 Nukleotiden). Die Rolle des HBoV als harmloser Passagier wird noch kontrovers diskutiert, da es häufig in Kombination mit anderen Erregern isoliert wird. HBoVs umfassen die vier Subtypen HBoV1, HBoV2, HBoV3 und HBoV4^(9,10).

Enteroviren und Rhinoviren sind einzelsträngige, ikosaedrische und unbehüllte RNA-Viren mit einer Genomgröße von etwa 7,2 kb⁽¹²⁻¹⁵⁾. Vor der Einführung molekularer Werkzeuge zur Klassifizierung von Krankheitserregern wurde angenommen, dass Rhinoviren und Enteroviren zwei sehr unterschiedliche Krankheitserreger sind⁽¹⁵⁾. Heute weiß man, dass sie genetisch miteinander verwandt sind. Sie gehören beide zur Gattung Enterovirus innerhalb der Familie Picornaviridae⁽¹³⁻¹⁷⁾. Die Humanen Enteroviren (HEV) umfassen die vier Spezies HEV-A, HEV-B, HEV-C und HEV-D mit

über 200 verschiedenen Serotypen. Rhinoviren werden in drei Spezies Rhinovirus A, Rhinovirus B und Rhinovirus C eingeteilt, die ca. 150 verschiedene Typen umfassen⁽¹²⁻¹⁸⁾. Wie Enteroviren und Rhinoviren gehören die humanen Parechoviren (HPeV) zur Familie der Picornaviridae allerdings werden sie der Gattung Parechovirus zugeordnet^(16,17,19-22). Sie sind einzelsträngige, unbehüllte RNA-Viren. HPeV umfasst 19 Genotypen (HPeV1 bis HPeV19), wobei HPeV1 und HPeV3 die häufigsten sind^(19,20).

Bei HAdV-Infektionen, die die Atemwege betreffen, werden erkältungsähnliche Symptome mit Fieber, Halsschmerzen, Erbrechen und Durchfall oder schwere Verläufe mit Konjunktivitis und Lungenentzündung berichtet^(3,7,8). HBoV-Infektionen zeigen Keuchen und Husten als häufige Symptome. Beide Viren sind weltweit verbreitet und treten das ganze Jahr über auf, wobei HBoV in den Winter- und Frühlingsmonaten einen Höhepunkt hat^(8,9).

Bei HEV-Infektionen der Atemwege werden Symptome wie Husten, Atemnot, Keuchen und Fieber berichtet⁽¹⁴⁾. In gemäßigten Breiten treten HEV-Infektionen häufiger im Sommer und Herbst und in tropischen Regionen ganzjährig auf⁽¹³⁾. Rhinoviren sind weltweit verbreitet, mit einer höheren Prävalenz im Frühjahr und Herbst^(12,15). Sie werden häufig bei Patienten mit Pneumonie, Bronchiolitis oder Mittelohrentzündung gefunden und können mit oder ohne Co-Erreger auftreten. Rhinoviren verursachen Symptome wie Rhinorrhoe, Halsschmerzen, Husten, Kopfschmerzen, verstopfte Nase und Unwohlsein⁽¹⁵⁾. Häufige Symptome einer HPeV-Infektion sind einerseits Erkältungssymptome wie Schnupfen, Fieber und andererseits Husten^(20,21,23).

Meist verlaufen virale Atemwegsinfektionen dieser Viren selbstlimitierend oder asymptomatisch, aber besonders Kinder, ältere Menschen und immungeschwächte Patienten können von einem schwereren Krankheitsverlauf betroffen sein^(7-9,14-16,19,22).

3. Testprinzip

Der RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Test ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus RNA, Bocavirus DNA und Adenovirus DNA aus humanen Nasen-/ Rachenabstrichen.

Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus (5'UTR), Bocavirus (5'NTR) und Adenovirus (Hexon) 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 Pediatric Viral Panel 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

| Kit Code | Reagenz | Menge | | Deckelfarbe |
|----------|----------------------|-------|---------|------------------------|
| 1 | Reaction Mix | 2 × | 1050 µl | gelb, gebrauchsfertig |
| 2 | Enzyme Mix | 1 × | 80 µl | rot, gebrauchsfertig |
| R | Internal Control RNA | 2 × | 1700 µl | braun, gebrauchsfertig |
| N | No Template Control | 1 × | 450 µl | weiß, gebrauchsfertig |
| 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

Keine.

6.2 Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Durchführung des RIDA®GENE Pediatric Viral Panel 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.

Weitere Details zum Safety Data Sheet (SDS) finden Sie unter der Artikelnummer auf <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

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.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA/RNA-Präparation aus Nasen- und Rachenabstrichen

Für die DNA/RNA-Präparation aus Nasen- und Rachenabstrichen 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 Pediatric Viral Panel 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 Pediatric Viral Panel Assay im Universalprofil verifiziert. Das bietet die Möglichkeit DNA und RNA Assays miteinander zu kombinieren.

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 | Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus/ | 465/510 | RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt |
| | ICR | 533/580 | |
| | Bocavirus | 533/610 | |
| | Adenovirus | 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 Certificate of Analysis |
| 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

Tab. 8: Interpretation der Ergebnisse*

| Nachweis von | | | | |
|---|-----------|------------|-----|---|
| Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus | Bocavirus | Adenovirus | ICR | Ergebnis |
| + | - | - | +/- | Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus nachweisbar |
| - | + | - | +/- | Bocavirus nachweisbar |
| - | - | + | +/- | Adenovirus nachweisbar |
| + | + | - | +/- | Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus & Bocavirus nachweisbar |
| + | - | + | +/- | Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus & Adenovirus nachweisbar |
| - | + | + | +/- | Bocavirus & Adenovirus nachweisbar |
| + | + | + | +/- | Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus; Bocavirus & Adenovirus nachweisbar |
| - | - | - | + | Zielgene nicht nachweisbar |
| - | - | - | - | Ungültig |

* + = positiv
- = negativ

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 Pediatric Viral Panel Test weist Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus RNA, Bocavirus DNA und Adenovirus DNA aus unbehandelten humanen Nasen-/ Rachenabstrichen 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 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 Pediatric Viral Panel 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 (Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus (5'UTR), Bocavirus (5'NTR) und Adenovirus (Hexon) vorhanden sind.
9. Die Substanzen Beclomethasondipropionat und Dihydrocodein können bereits in geringen Mengen interferierende Eigenschaften aufweisen. ratioAllerg® 50µg (Beclomethasondipropionat) führt ab einer Konzentration von 5 % [v/v] zu einem interferierenden Effekt auf den Nachweis von Adenovirus. Paracodin® N-Tropfen (Dihydrocodein) führen ab der geringsten getesteten Konzentration von 3,0 % [v/v] zu einem interferierenden Effekt auf den Nachweis von Enter-/Rhino-/Parechovirus und der Detektion der IC.
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 Gerätenachweisgrenze

Zur Ermittlung der Gerätenachweisgrenze wurden 20 Replikate einer Kontrollprobe (50 Kopien/Reaktion (Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus/ Bocavirus / Adenovirus)) 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 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 (Nasen-/Rachenabstriche) vorliegen könnten, untersucht.

Substanzen, die möglicherweise die Testergebnisse signifikant beeinflussen könnten, wurden zunächst mit hohen Konzentrationen (dreifache Tagesdosis oder Simulation des „worst case“) in einem Interferenz-Screen untersucht. 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 |
|--|---------------|
| Amoxicillin-ratiopharm® 1000 mg Filmtabletten (Amoxicillin) | 1 mg/ml |
| Azithromycin-ratiopharm® 500 mg Filmtabletten (Azithromycin) | 84 mg/ml |
| Humanblut | 2 % [v/v] |
| Mucine | 60 µg/ml |
| Nasenspray ratiopharm® (Xylometazolin) | 10 % [v/v] |
| Natriumchlorid | 10 % [v/v] |
| neo-angin® Spray (Benzydaminhydrochlorid) | 10 % [v/v] |
| Oseltamivirphosphat | 25 mg/ml |
| Paracetamol-ratiopharm® 500 mg Tabletten (Paracetamol) | 10 mg/ml |

Für die Substanzen ratioAllerg® 50µg (Beclomethasondipropionat) (5 % [v/v]) und Paracodin® N-Tropfen (Dihydrocodein) (3,0 % [v/v]) wurden inhibitorische Effekte beobachtet (siehe Grenzen der Methode).

Kreuzreaktivität

Verschiedene Organismen (Bakterien, Viren, Pilze), die häufig in der Matrix Nasen-/Rachenabstrichen vorkommen können, wurden untersucht. Die Auswahl der zu untersuchenden Mikroorganismen für diesen Assay beruhte entweder darauf, dass diese natürlicherweise in der Matrix zu finden ist oder als respiratorische Erreger entsprechende Symptome hervorrufen. Für Analysen wurden Bakterien- (zwischen 10⁶ und 10⁹ CFU*/ml), Pilz- oder Viruskulturen, Überstände von Bakterien-, Pilz- oder Viruskulturen sowie LGC- und NIBSC-Standards der jeweiligen Organismen verwendet.

Die RIDA®GENE Pediatric Viral Panel multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus, Bocavirus und Adenovirus. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 11):

Tab. 11: Potentiell kreuzreaktive Organismen

| Organismus | Testergebnis* | | |
|--|---|-----------|------------|
| | Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus | Bocavirus | Adenovirus |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> strain 5377 | - | - | - |
| <i>Aspergillus terreus</i> | - | - | - |
| <i>Bordetella parapertussis</i> strain 12822 | - | - | - |
| <i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1 | - | - | - |
| <i>Candida albicans</i> | - | - | - |
| <i>Chlamydophila pneumoniae</i> | - | - | - |
| <i>Chlamydia psittaci</i> | - | - | - |
| <i>Clostridium perfringens</i> | - | - | - |
| <i>Corynebacterium diphtheria</i> | - | - | - |
| Epstein-Barr-Virus B95-8 strain | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> (O157:H7) | - | - | - |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | - | - | - |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | - | - | - |
| Herpes simplex virus 1 strain McIntyre | - | - | - |
| Herpes simplex virus 2 strain MS | - | - | - |
| Human Coronavirus 229E | - | - | - |
| Human Coronavirus OC43 | - | - | - |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Human Coronavirus SARS-CoV-2 (Isolate: Italy-INMI1) | - | - | - |
| MERS-CoV strain: Florida/USA-2 Saudi Arabia 2014 | - | - | - |
| Human Cytomegalovirus | - | - | - |
| Human Metapneumovirus | - | - | - |
| Human parainfluenza virus 1 strain C35 | - | - | - |
| Human parainfluenza virus 2 strain Greer | - | - | - |
| Parainfluenza virus serotype 3 | - | - | - |
| Parainfluenza virus 4a strain M-25 | - | - | - |
| Human respiratory syncytial virus strain Long | - | - | - |
| Human respiratory syncytial virus strain 9320 | - | - | - |
| Influenza A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2) | - | - | - |
| Influenza A/Victoria/2570/2019 (H1N1) | - | - | - |
| Influenza B/Washington/02/2019 | - | - | - |
| Influenza B/Phuket/3073/2013 (Yamagata-Linie) | - | - | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MGH78578 | - | - | - |
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> | - | - | - |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> | - | - | - |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> strain FH od Eaton Agent | - | - | - |
| <i>Neisseria meningitidis</i> strain FAM18 | - | - | - |
| <i>Proteus vulgaris</i> | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | - | - |
| <i>Serratia marcescens</i> | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | - | - | - |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | - | - | - |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> strain NCTC 7465 | - | - | - |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | - | - | - |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | - | - | - |

- = negativ

13.1.4 Präzision

Die Präzision des RIDA®GENE Pediatric Viral Panel 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.

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 Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR Test auf dem LightCycler® 480 II lag bei 3,16 %.

Tab. 12: Ergebnisse der Präzision des RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Tests für Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus.

| Ct- Mittelwert / VK | <i>Intra-Assay</i> | | | <i>Inter-Assay</i> | | | <i>Inter- Lot</i> |
|---------------------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|-----------------------|
| | 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 | 31,0 | 30,6 | 30,9 | 31,9 | 31,9 | 31,6 |
| | VK (%) | 1,11 % | 1,49 % | 0,75 % | 2,09 % | 2,43 % | 2,06 % |
| 3 | Ct | 32,0 | 31,9 | 31,8 | 33,3 | 32,8 | 33,0 |
| | VK (%) | 1,22 % | 1,29 % | 1,19 % | 2,04 % | 2,50 % | 1,91 % |
| 4 | Ct | 22,8 | 22,8 | 22,5 | 23,9 | 23,7 | 23,7 |
| | VK (%) | 1,12 % | 0,96 % | 0,91 % | 2,87 % | 3,16 % | 2,45 % |
| 5 | Ct | 26,1 | 25,9 | 26,2 | 27,2 | 26,9 | 27,0 |
| | VK (%) | 0,83 % | 0,83 % | 0,78 % | 2,12 % | 2,00 % | 2,19 % |

Tab. 13: Ergebnisse der Präzision des RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Tests für Bocavirus.

| Ct- Mittelwert / VK | <i>Intra-Assay</i> | | | <i>Inter-Assay</i> | | | <i>Inter- Lot</i> | |
|---------------------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|-----------------------|--------|
| | 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 | 30,5 | 30,5 | 30,5 | 30,9 | 30,9 | 30,8 | 30,9 |
| | VK (%) | 0,91 % | 0,67 % | 0,70 % | 1,25 % | 1,03 % | 1,16 % | 1,16 % |
| 3 | Ct | 31,4 | 31,5 | 31,6 | 32,2 | 32,1 | 32,2 | 32,2 |
| | VK (%) | 0,91 % | 0,77 % | 1,15 % | 1,24 % | 1,43 % | 1,83 % | 1,52 % |
| 4 | Ct | 22,5 | 23,0 | 22,6 | 23,5 | 23,4 | 23,4 | 23,4 |
| | VK (%) | 1,03 % | 0,76 % | 0,53 % | 1,26 % | 1,66 % | 1,56 % | 1,50 % |
| 5 | Ct | 25,7 | 25,7 | 26,2 | 26,5 | 26,5 | 26,6 | 26,5 |
| | VK (%) | 0,69 % | 0,49 % | 0,74 % | 1,17 % | 1,15 % | 0,96 % | 1,10 % |

Tab. 14: Ergebnisse der Präzision des RIDA®GENE Pediatric Viral Panel Tests für Adenovirus.

| Ct- Mittelwert / VK | <i>Intra-Assay</i> | | | <i>Inter-Assay</i> | | | <i>Inter-Lot</i> | |
|---------------------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|------------------|--------|
| | 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 | 31,1 | 31,3 | 31,3 | 31,7 | 31,8 | 31,8 | 31,7 |
| | VK (%) | 1,15 % | 1,08 % | 1,38 % | 1,50 % | 1,51 % | 1,09 % | 1,38 % |
| 3 | Ct | 32,7 | 32,5 | 32,4 | 33,0 | 32,9 | 33,0 | 33,0 |
| | VK (%) | 0,87 % | 0,80 % | 1,11 % | 2,05 % | 1,39 % | 1,66 % | 1,72 % |
| 4 | Ct | 23,7 | 23,9 | 23,6 | 24,3 | 24,4 | 24,4 | 24,4 |
| | VK (%) | 1,05 % | 0,77 % | 0,65 % | 1,98 % | 1,46 % | 1,69 % | 1,72 % |
| 5 | Ct | 27,1 | 26,8 | 27,4 | 27,3 | 27,4 | 27,5 | 27,4 |
| | VK (%) | 0,93 % | 0,83 % | 0,68 % | 1,85 % | 1,65 % | 1,23 % | 1,62 % |

13.1.5 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des RIDA®GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR Tests wurde an einem definierten Panel an Viren-Stämmen/Subtypen untersucht (s. Tab. 15).

Tab. 15: Analytische Reaktivitätstestung

| Stamm | Konzentration | Ergebnis* | | |
|--|---|---|-----------|------------|
| | | Rhinovirus/ Enterovirus/ Parechovirus | Bocavirus | Adenovirus |
| Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71 (subgroup C) | 1 x 10 ⁻⁵ µg/ml | - | - | + |
| Adenovirus 40, human, strain Dugan (subgroup F) | 1,26 U/ml | - | - | + |
| Adenovirus 41, human, strain Tak (subgroup F) | 1,17 x 10 ¹ TCID ₅₀ /ml | - | - | + |
| Adenovirus Type 2 (subgroup C) | 8,51 x 10 ³ TCID ₅₀ /ml | - | - | + |
| Adenovirus Type 3 (subgroup B) | 1 x 10 ^{3,23} U/ml | - | - | + |
| Adenovirus Type 4 (subgroup E) | 1,41 U/ml | - | - | + |
| Adenovirus Type: 11 (subgroup B) | 1 x 10 ^{0,29} U/ml | - | - | + |
| Adenovirus Type: 31 (subgroup A) | 1 x 10 ^{0,15} U/ml | - | - | + |
| Adenovirus Type: 37 (subgroup D) | 1 x 10 ^{-1,98} U/ml | - | - | + |
| Adenovirus Type: 5 Stock strain: N/A (subgroup C) | 1:100 | - | - | + |
| Adenovirus Type: 7A (subgroup B) | 1 x 10 ^{3,06} U/ml | - | - | + |
| Bocavirus, HBoV1 | 1:10 ⁶ | - | + | - |
| Enterovirus A – Coxsackievirus A2, strain Fleetwood | 1,51 x 10 ² U/ml | + | - | - |
| Enterovirus A – Enterovirus Type 71, strain 2003 Isolate | 4,57 TCID ₅₀ /ml | + | - | - |
| Enterovirus B – Coxsackievirus B4 | 1 x 10 ^{2,5} U/ml | + | - | - |
| Enterovirus B – Echovirus 11 | 5,89 x 10 ¹ U/ml | + | - | - |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Enterovirus C – Coxsackievirus A21, strain Kuykendall | 1 x 10 ^{3,29} U/ml | + | - | - |
| Enterovirus C – Coxsackievirus A24, strain DN-19 | 1:10 ⁴ | + | - | - |
| Enterovirus D – Enterovirus Type 68, strain 2007 isolate | 1,26 x 10 ² TCID ₅₀ /ml | + | - | - |
| Enterovirus D – Enterovirus Type 70, strain J670/71 | 1:10 ⁵ | + | - | - |
| Parechovirus Type 1, strain Harris | 3,39 x 10 ⁴ U/ml | + | - | - |
| Parechovirus Type 3 | 4,07 x 10 ³ TCID ₅₀ /ml | + | - | - |
| Rhinovirus Type 1A | 4,17 x 10 ¹ U/ml | + | - | - |
| Rhinovirus A16 | 1,26 x 10 ² U/ml | + | - | - |
| Rhinovirus A80 | 1,17 x 10 ¹ U/ml | + | - | - |
| Rhinovirus B14 | 1,05 x 10 ¹ TCID ₅₀ /ml | + | - | - |
| Rhinovirus B42 | 2,45 x 10 ² U/ml | + | - | - |
| Rhinovirus B70 | 1,70 x 10 ² U/ml | + | - | - |

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










- = negative

14. Versionsübersicht






| Versionsnummer | Kapitel und Bezeichnung |
|----------------|-------------------------|
| 2022-03-03 | Freigabeversion |

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

| | |
|---|-------------------------------|
|  | <i>In-vitro</i> -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. Brini I, Guerrero A, Hannachi N, Bouguila J, Orth-Höller D, Bouhlel A, u. a. Epidemiology and clinical profile of pathogens responsible for the hospitalization of children in Sousse area, Tunisia. *PloS One*. 2017;12(11):e0188325.
2. Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. Oktober 2018;24(10):1055–63.
3. Ma X, Conrad T, Alchikh M, Reiche J, Schweiger B, Rath B. Can we distinguish respiratory viral infections based on clinical features? A prospective pediatric cohort compared to systematic literature review. *Rev Med Virol*. September 2018;28(5):e1997.
4. Mummidi PS, Tripathy R, Dwibedi B, Mahapatra A, Baraha S. Viral aetiology of wheezing in children under five. *Indian J Med Res*. Februar 2017;145(2):189–93.
5. Sonawane AA, Shastri J, Bavdekar SB. Respiratory Pathogens in Infants Diagnosed with Acute Lower Respiratory Tract Infection in a Tertiary Care Hospital of Western India Using Multiplex Real Time PCR. *Indian J Pediatr*. Mai 2019;86(5):433–8.
6. PERCH study group (The Pneumonia Etiology Research for Child Health Study Group). Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study. *Lancet Lond Engl*. 31. August 2019;394(10200):757–79.
7. Robert-Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 22/2019. 29. Mai 2019;6.
8. Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. *Microbiol Spectr*. August 2016;4(4).
9. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, u. a. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 21. Oktober 2016;22(39):8684–97.
10. Christensen A, Kesti O, Elenius V, Eskola AL, Døllner H, Altunbulakli C, u. a. Human bocaviruses and paediatric infections. *Lancet Child Adolesc Health*. Juni 2019;3(6):418–26.
11. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol*. Januar 2012;22(1):46–64.
12. Greenberg SB. Update on rhinovirus and coronavirus infections. *Semin Respir Crit Care Med*. August 2011;32(4):433–46.
13. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol*. Januar 2015;235(2):217–28.
14. Messacar K, Abzug MJ, Dominguez SR. The Emergence of Enterovirus-D68. *Microbiol Spectr*. Juni 2016;4(3).

15. To KKW, Yip CCY, Yuen K-Y. Rhinovirus - From bench to bedside. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*. Juli 2017;116(7):496–504.
16. Hayes A, Nguyen D, Andersson M, Antón A, Bailly J-L, Beard S, u. a. A European multicentre evaluation of detection and typing methods for human enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *J Med Virol*. August 2020;92(8):1065–74.
17. Simonen-Tikka M-L, Klemola P, Suomenrinne S, Kajjalainen S, Söderström D, Savolainen-Kopra C, u. a. Virus infections among young children--the first year of the INDIS study. *J Med Virol*. September 2013;85(9):1678–84.
18. Cox DW, Le Souëf PN. Rhinovirus and the developing lung. *Paediatr Respir Rev*. September 2014;15(3):268–74.
19. Chen B-C, Chang J-T, Huang T-S, Chen J-J, Chen Y-S, Jan M-W, u. a. Parechovirus A Detection by a Comprehensive Approach in a Clinical Laboratory. *Viruses*. 12. Dezember 2018;10(12).
20. McNeale D, Wang CYT, Arden KE, Mackay IM. HPeV-3 predominated among Parechovirus A positive infants during an outbreak in 2013-2014 in Queensland, Australia. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2018;98:28–32.
21. Piralla A, Furione M, Rovida F, Marchi A, Stronati M, Gerna G, u. a. Human parechovirus infections in patients admitted to hospital in Northern Italy, 2008-2010. *J Med Virol*. April 2012;84(4):686–90.
22. Sillanpää S, Oikarinen S, Sipilä M, Seppälä E, Nurminen N, Rautiainen M, u. a. Human parechovirus as a minor cause of acute otitis media in children. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. Januar 2015;62:106–9.
23. Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, u. a. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. September