

## RIDA® GENE Pediatric Viral Panel

**REF** PG4725



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](http://www.r-biopharm.com)



## 1. Campo di applicazione

Usato per la diagnostica in vitro. Il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel, eseguito sullo strumento di PCR real-time LightCycler® 480 II, è una RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dell'RNA di rhinovirus/enterovirus/parechovirus, del DNA di bocavirus e del DNA di adenovirus in tamponi nasali/faringei umani non trattati di soggetti che presentano segni e sintomi di un'infezione respiratoria.

Il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel è concepito per supportare la diagnosi differenziale delle infezioni da rhinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus e adenovirus in pazienti con sintomi di infezione respiratoria in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono l'infezione da rhinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus o adenovirus e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi.

Il prodotto è destinato all'uso professionale.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Le infezioni virali delle vie respiratorie sono una delle cause primarie di ricoveri e visite cliniche nei bambini e negli anziani <sup>(1-6)</sup>. Oltre ai virus respiratori noti come l'influenza e il SARS-CoV-2, anche adenovirus, bocavirus, enterovirus, parechovirus e rhinovirus possono causare infezioni delle vie respiratorie.

Gli adenovirus umani (HAdV) appartengono alla famiglia Adenoviridae e al genere Mastadenovirus. Sono virus a DNA a doppio filamento, a forma di icosaedro, senza involucro, con un diametro compreso tra 65 e 110 nm. Sono suddivisi in sette specie (da A a G), che comprendono circa 67 sierotipi <sup>(7,8)</sup>.

I bocavirus umani (HBoV) sono parvovirus icosaedrici, piccoli e senza involucro <sup>(9-11)</sup>. Hanno un diametro compreso tra circa 18 nm e 26 nm e DNA a filamento singolo, con una dimensione del genoma da 4 kb a 6 kb (più le sequenze terminali di 32-52 nucleotidi). Il ruolo degli HBoV come passeggeri innocui è ancora controverso, perché sono spesso isolati in combinazione con altri agenti patogeni. Gli HBoV comprendono quattro sottotipi: HBoV1, HBoV2, HBoV3 e HBoV4 <sup>(9,10)</sup>.

Enterovirus e rhinovirus sono virus a RNA a filamento singolo, icosaedrici, senza involucro, con una dimensione del genoma di circa 7,2 kb <sup>(12-15)</sup>. Prima dell'introduzione degli strumenti molecolari per classificare i patogeni, rinovirus ed enterovirus erano considerati due patogeni molto diversi <sup>(15)</sup>. Oggi sappiamo che sono geneticamente correlati tra loro. Appartengono entrambi al genere Enterovirus all'interno della famiglia Picornaviridae <sup>(13-17)</sup>. Gli enterovirus umani (HEV) comprendono quattro specie, HEV-A, HEV-B, HEV-C e HEV-D, con più di 200 sierotipi diversi. I rinovirus sono suddivisi in tre specie, rhinovirus A, rhinovirus B e rhinovirus C, che comprendono circa 150 tipi diversi <sup>(12-18)</sup>. Come gli enterovirus e i rhinovirus, i parechovirus umani (HPeV) appartengono alla famiglia Picornaviridae,

ma sono classificati nel genere Parechovirus <sup>(16,17,19-22)</sup>. Gli HPeV sono virus a RNA a filamento singolo e senza involucro. Gli HPeV comprendono 19 genotipi (da HPeV1 a HPeV19), tra i quali HPeV1 e HPeV3 sono i più comuni <sup>(19,20)</sup>.

Le infezioni da HAdV che colpiscono le vie respiratorie sono segnalate con sintomi comuni simili a quelli del raffreddore, inclusi febbre, gola infiammata, vomito e diarrea; sono anche segnalate infezioni gravi con congiuntivite e infiammazione polmonare <sup>(3,7,8)</sup>. Le infezioni da HBoV inducono comunemente respiro sibilante e tosse. Entrambi i virus sono distribuiti in tutto il mondo e si presentano in ogni stagione, ma l'HBoV raggiunge il picco nei mesi invernali e primaverili <sup>(8,9)</sup>.

I sintomi delle infezioni da HEV delle vie respiratorie includono tosse, mancanza di respiro, respiro sibilante e febbre <sup>(14)</sup>. Le infezioni da HEV sono più comuni in estate e autunno nei climi temperati e si verificano in ogni stagione nelle regioni tropicali <sup>(13)</sup>. I rinovirus sono distribuiti in tutto il mondo, con una maggiore prevalenza in primavera e autunno <sup>(12,15)</sup>. Si presentano comunemente nei pazienti con polmonite, bronchiolite o un'infezione dell'orecchio medio e possono presentarsi con o senza copatogeni. I rinovirus provocano sintomi come rinorrea, gola infiammata, tosse, cefalea, congestione nasale e malessere <sup>(15)</sup>. I sintomi comuni di un'infezione da HPeV sono quelli del raffreddore, come naso chiuso, febbre e tosse <sup>(20,21,23)</sup>.

Solitamente, le infezioni respiratorie virali con questi virus sono autolimitanti o asintomatiche, ma i bambini, gli anziani e i pazienti con immunodeficienza possono sviluppare forme gravi di malattia <sup>(7-9,14-16,19,22)</sup>.

### 3. Principio del test

Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Pediatric Viral Panel è una RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dell'RNA di rinovirus/ enterovirus/ parechovirus, del DNA di bocavirus e del DNA di adenovirus in tamponi nasali/faringei umani.

Dopo l'isolamento del DNA, vengono amplificati (se presenti) i frammenti genici specifici di rinovirus/enterovirus/parechovirus (5'UTR), bocavirus (5'NTR) e adenovirus (esone). 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 fluorescente aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Pediatric Viral Panel contiene un **Internal Control RNA** (ICR) che serve a 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

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del tappo
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	giallo, pronto per l'uso
2	Enzyme Mix	1 ×	80 µL	rosso, pronto per l'uso
R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µL	marrone, pronto per l'uso
N	No Template Control	1 ×	450 µL	bianco, pronto per l'uso
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 °C-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 °C-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 congelamento e scongelamento

## 6. Reagenti necessari ma non forniti

### 6.1 Reagenti

Nessuno.

### 6.2 Attrezzatura di laboratorio

Per eseguire il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel è necessaria la seguente attrezzatura:

<b>Attrezzatura</b>
Piattaforma di estrazione: Strumento MagNA Pure 96 (Roche)
Strumento di 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, 100-1000 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](mailto: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 crociata e risultati falsi positivi è necessario utilizzare locali separati e indumenti e strumenti dedicati per l'estrazione, la preparazione e l'esecuzione della PCR.

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

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 mescolare 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 tenuti al corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Ulteriori dettagli sulla scheda di dati di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) sono disponibili cercando il codice articolo alla pagina <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

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

## 8. Raccolta e conservazione dei campioni

### 8.1 Preparazione del DNA/RNA da tamponi nasali e faringei

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

Il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel 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 dell'inibizione oppure come controllo del processo (estrazione e controllo inibizione).

Quando l'**Internal Control RNA** viene utilizzato solo come controllo di inibizione per l'amplificazione, è necessario aggiungere 1 µL di **Internal Control RNA** alla master mix (vedere Tabella 4).

Quando l'**Internal Control RNA** viene utilizzato 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**. Si consiglia, se possibile, di aggiungere l'Internal Control RNA alla cartuccia del campione prima di aggiungere il campione. Si raccomanda di pipettare 1 µL di **Internal Control RNA** per reazione nella PCR mix sia per il controllo negativo, sia per il controllo positivo.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Preparazione della master mix

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

Si consiglia di aggiungere un ulteriore 10% di volume alla master mix per compensare eventuali perdite durante il pipettaggio (vedere Tabella 3 e Tabella 4).

Prima dell'uso,

scongela **Reaction Mix**, **Enzyme Mix**, **Positive Control**, **No Template Control** e **Internal Control RNA**, miscelare mediante agitatore a vortice (tranne l'Enzyme Mix) e centrifugare brevemente. I reagenti devono essere sempre adeguatamente raffreddati durante le fasi di lavoro (2 °C-8 °C).

**Tabella 3:** Esempio di calcolo e preparazione 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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µL	212,3 µL
2	<b>Enzyme Mix</b>	0,7 µL	7,7 µL
	<b>Totale</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

Mescolare 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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µL	212,3 µL
2	<b>Enzyme Mix</b>	0,7 µL	7,7 µL
R	<b>Internal Control RNA</b>	1,0 µL	11 µL
	<b>Totale</b>	<b>21,0 µL</b>	<b>231,0 µL</b>

Mescolare la master mix e quindi centrifugare per breve tempo.

## 9.2 Preparazione della PCR mix

Pipettare 20 µL della master mix in ogni cuvetta di reazione (piastre).

**Controllo negativo:** Aggiungere 5 µL di **No Template Control** a ciascuna master mix pipettata in precedenza.

**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:** Aggiungere 5 µL di eluato a ciascuna master mix pipettata in precedenza.

**Controllo positivo:** Aggiungere 5 µL di **Positive Control** a ciascuna master mix pipettata in precedenza.

**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 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 (vedere Tabella 5 e Tabella 6).

## 9.3 Impostazioni dello strumento per PCR

### 9.3.1 Profilo universale della PCR real-time

Per armonizzare i test RIDA®GENE, il test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel è stato verificato nel profilo universale. Questo rende possibile combinare tra loro i test del DNA e dell'RNA.

**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
<u>PCR</u> 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	Rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
	Bocavirus	533/610	
	Adenovirus	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 presente a una concentrazione di  $10^3$  copie/ $\mu$ L. Viene utilizzato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  copie in ogni ciclo di PCR.

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

Campione	Risultato	Ct ICR	Ct gene target
Controllo positivo	Positivo	N/A *1	Vedere il Certificato di Analisi (Certificate of Analysis)
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
- Correttezza della procedura di esecuzione del test

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

## 11. Interpretazione del risultato

**Tabella 8:** Interpretazione del risultato\*

Rivelazione di				
Rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus	Bocavirus	Adenovirus	ICR	Risultato
+	-	-	+/-	Rhinovirus/enterovirus/ parechovirus rivelabili
-	+	-	+/-	Bocavirus rivelabile
-	-	+	+/-	Adenovirus rivelabile
+	+	-	+/-	Rhinovirus/enterovirus/ parechovirus e bocavirus rivelabili
+	-	+	+/-	Rhinovirus/enterovirus/ parechovirus e adenovirus rivelabili
-	+	+	+/-	Bocavirus e adenovirus rivelabili
+	+	+	+/-	Rhinovirus/enterovirus/ parechovirus, bocavirus e adenovirus rivelabili
-	-	-	+	Geni target non rivelabili
-	-	-	-	Non valido

\* + = positivo  
- = negativo

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

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

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

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

## 12. Limiti del metodo

1. Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Pediatric Viral Panel rivela l'RNA di rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus, il DNA di bocavirus e il DNA di adenovirus in tamponi nasali/faringei umani 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.
4. Procedure inadeguate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento o un carico di 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 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<sup>®</sup>GENE Pediatric Viral Panel.
8. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un risultato positivo indica la presenza dei geni target (rhinovirus/enterovirus/parechovirus (5'UTR), bocavirus (5'NTR) e adenovirus (esone)).
9. Le sostanze beclometasone dipropionato e diidrocodeina possono avere proprietà interferenti, anche in piccole quantità. A partire da una concentrazione del 5% [v/v], ratioAllerg<sup>®</sup> 50 µg (beclometasone dipropionato) ha un effetto interferente sulla rivelazione dell'adenovirus. Le gocce di Paracodin<sup>®</sup> N (diidrocodeina) hanno un effetto interferente sulla rivelazione di enterovirus/rhinovirus/parechovirus e sulla rivelazione dell'IC a partire dalla più bassa concentrazione testata del 3,0% [v/v].
10. Questo test deve essere eseguito in conformità con il regolamento sulle buone pratiche di laboratorio (BPL). Gli operatori devono seguire esattamente le istruzioni del fabbricante durante l'esecuzione del test.

## 13. Prestazioni e caratteristiche

### 13.1 Prestazioni e caratteristiche analitiche

#### 13.1.1 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 (rhinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus, adenovirus)) 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 PCR e di 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 respiratorie o a causa della loro presenza diffusa nei campioni corrispondenti (tamponi nasali/faringei).

Le sostanze che potrebbero influenzare in modo significativo i risultati del test sono state esaminate inizialmente ad alte concentrazioni (il triplo della dose giornaliera o la simulazione del caso peggiore) in un'analisi di interferenza. 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
Amoxicillin-ratiopharm® compresse rivestite con film da 1000 mg (amoxicillina)	1 mg/mL
Azithromycin-ratiopharm® compresse rivestite con film da 500 mg (azitromicina)	84 mg/mL
Sangue umano	2% [v/v]
Mucine	60 µg/mL
Nasenspray-ratiopharm® spray nasale (xilometazolina)	10% [v/v]
Cloruro di sodio	10% [v/v]
Neo-angin® spray (benzidamina cloridrato)	10% [v/v]
Oseltamivir fosfato	25 mg/mL
Paracetamol-ratiopharm® compresse da 500 mg (paracetamolo)	10 mg/mL

Sono stati osservati effetti inibitori per le sostanze ratioAllerg® 50 µg (beclometasone dipropionato) (5% [v/v]) e Paracodin® N gocce (diidrocodeina) (3,0% [v/v]) (vedere Limiti del metodo).

### Reattività crociata

Sono stati studiati vari organismi (batteri, virus, funghi) che si trovano comunemente nella matrice dei tamponi nasali/faringei. I microrganismi da studiare per questo test sono stati scelti perché si trovano naturalmente nella matrice o causano sintomi corrispondenti ai patogeni respiratori. Per le analisi sono state utilizzate colture batteriche (tra 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> CFU\*/mL); colture fungine o virali; surnatanti di colture batteriche, fungine o virali; e standard LGC e NIBSC dei particolari organismi.

Il test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Pediatric Viral Panel è specifico per rhinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus e adenovirus. Non sono state rivelate reattività crociate con le seguenti specie (vedere Tabella 11):

**Tabella 11:** Organismi potenzialmente cross-reattivi

Organismo	Risultato del test*		
	Rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus	Bocavirus	Adenovirus
<i>Acinetobacter baumannii</i> , ceppo 5377	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-
<i>Bordetella parapertussis</i> , ceppo 12822	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	-	-
Virus di Epstein-Barr, ceppo B95-8	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-
Virus dell'herpes simplex 1, ceppo McIntyre	-	-	-
Virus dell'herpes simplex 2, ceppo MS	-	-	-
Coronavirus 229E umano	-	-	-
Coronavirus OC43 umano	-	-	-
Coronavirus umano SARS-CoV-2 (isolato: Italia-INMI1)	-	-	-

MERS-CoV, ceppo: Florida/USA-2 Arabia Saudita 2014	-	-	-
Cytomegalovirus umano	-	-	-
Metapneumovirus umano	-	-	-
Virus parainfluenzale umano 1, ceppo C35	-	-	-
Virus parainfluenzale umano 2, ceppo Greer	-	-	-
Virus parainfluenzale umano sierotipo 3	-	-	-
Virus parainfluenzale 4a, ceppo M-25	-	-	-
Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo Long	-	-	-
Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo 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 lineage)	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ceppo MGH 78578	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , ceppo FH di agente Eaton	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> , ceppo 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> ceppo NCTC 7465	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	-	-

- = negativo

### 13.1.4 Precisione

La precisione del test di RT-PCR real-time RIDA®GENE Pediatric Viral Panel è stata determinata per i seguenti livelli di valutazione.

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.

I test di precisione *intra*-test e *inter*-test sono stati condotti 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 di RT-PCR real-time RIDA®GENE Pediatric Viral Panel su LightCycler® 480 II è stato del 3,16%.

**Tabella 12:** Risultati della precisione del test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel per rhinovirus/enterovirus/parechovirus.

Valore medio Ct / CV	<i>Intra</i> -test			<i>Inter</i> -test			<i>Inter</i> -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.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
2	Ct	31,0	30,6	30,9	31,9	31,9	31,6
	CV (%)	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
	CV (%)	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
	CV (%)	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
	CV (%)	0,83%	0,83%	0,78%	2,12%	2,00%	2,19%

**Tabella 13:** Risultati della precisione del test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel per il bocavirus.

Valore medio Ct / CV	<i>Intra-test</i>			<i>Inter-test</i>			<i>Inter-lotto</i>
	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.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
2	Ct	30,5	30,5	30,5	30,9	30,9	30,8
	CV (%)	0,91%	0,67%	0,70%	1,25%	1,03%	1,16%
3	Ct	31,4	31,5	31,6	32,2	32,1	32,2
	CV (%)	0,91%	0,77%	1,15%	1,24%	1,43%	1,83%
4	Ct	22,5	23,0	22,6	23,5	23,4	23,4
	CV (%)	1,03%	0,76%	0,53%	1,26%	1,66%	1,56%
5	Ct	25,7	25,7	26,2	26,5	26,5	26,6
	CV (%)	0,69%	0,49%	0,74%	1,17%	1,15%	0,96%

**Tabella 14:** Risultati della precisione del test RIDA®GENE Pediatric Viral Panel per l'adenovirus.

Valore medio Ct / CV	<i>Intra-test</i>			<i>Inter-test</i>			<i>Inter-lotto</i>
	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.
	CV (%)	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile	non disponibile
2	Ct	31,1	31,3	31,3	31,7	31,8	31,8
	CV (%)	1,15%	1,08%	1,38%	1,50%	1,51%	1,09%
3	Ct	32,7	32,5	32,4	33,0	32,9	33,0
	CV (%)	0,87%	0,80%	1,11%	2,05%	1,39%	1,66%
4	Ct	23,7	23,9	23,6	24,3	24,4	24,4
	CV (%)	1,05%	0,77%	0,65%	1,98%	1,46%	1,69%
5	Ct	27,1	26,8	27,4	27,3	27,4	27,5
	CV (%)	0,93%	0,83%	0,68%	1,85%	1,65%	1,23%

### 13.1.5 Reattività analitica

La reattività del test di RT-PCR real-time RIDA® GENE Pediatric Viral Panel è stata esaminata su un gruppo definito di ceppi/sottotipi virali (vedere Tabella 15).

**Tabella 15:** Test di reattività analitica

Ceppo	Concentrazione	Risultato*		
		Rhinovirus/ enterovirus/ parechovirus	Bocavirus	Adenovirus
Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71 (sottogruppo C)	1 x 10 <sup>-5</sup> µg/mL	-	-	+
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan (sottogruppo F)	1,26 U/mL	-	-	+
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak (sottogruppo F)	1,17 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adenovirus tipo 2 (sottogruppo C)	8,51 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adenovirus tipo 3 (sottogruppo B)	1 x 10 <sup>3,23</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 4 (sottogruppo E)	1,41 U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 11 (sottogruppo B)	1 x 10 <sup>0,29</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 31 (sottogruppo A)	1 x 10 <sup>0,15</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 37 (sottogruppo D)	1 x 10 <sup>-1,98</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 5 stock ceppo N/A (sottogruppo C)	1:100	-	-	+
Adenovirus tipo 7A (sottogruppo B)	1 x 10 <sup>3,06</sup> U/mL	-	-	+
Bocavirus, HBoV1	1:10 <sup>6</sup>	-	+	-
Enterovirus A - coxsackievirus A2, ceppo Fleetwood	1,51 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus A - enterovirus tipo 71, ceppo isolato nel 2003	4,57 TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Enterovirus B - coxsackievirus B4	1 x 10 <sup>2,5</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus B - echovirus 11	5,89 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-

Enterovirus C - coxsackievirus A21, ceppo Kuykendall	1 x 10 <sup>3,29</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus C - coxsackievirus A24, ceppo DN-19	1:10 <sup>4</sup>	+	-	-
Enterovirus D - enterovirus tipo 68, ceppo isolato nel 2007	1,26 x 10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Enterovirus D - enterovirus tipo 70, ceppo J670/71	1:10 <sup>5</sup>	+	-	-
Parechovirus tipo 1, ceppo Harris	3,39 x 10 <sup>4</sup> U/mL	+	-	-
Parechovirus tipo 3	4,07 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rhinovirus tipo 1A	4,17 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus A16	1,26 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus A80	1,17 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus B14	1,05 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rhinovirus B42	2,45 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Rhinovirus B70	1,70 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-

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

- = negativo

#### 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e denominazione
2022-03-03	Versione di rilascio

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Uso per la diagnostica <i>in vitro</i>
	Attenersi al manuale operativo
	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. 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, Kaijalainen 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