

## RIDA® GENE Pediatric Viral Panel

**REF** PG4725



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

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



## 1. Aplicação

Para utilização em diagnóstico *in vitro*. O teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel, realizado no instrumento LightCycler® 480 II real-time PCR é um RT-PCR multiplex em tempo real para a detecção qualitativa direta e diferenciação de RNA rinovirus/ enterovirus/ parechovirus, DNA bocavirus e DNA adenovirus em esfregaços nasais/garganta humanas não tratados de pessoas com sinais e sintomas de infecção respiratória.

O teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel se destina a apoiar o diagnóstico diferencial de infecções por rinovirus/enterovirus/parechovirus em pacientes com sintomas de infecção respiratória com outros achados clínicos e laboratoriais. Resultados negativos não excluem a infecção por rinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus ou adenovirus e não devem ser utilizados como única base para o diagnóstico.

O produto é destinado à utilização profissional.

## 2. Sumário e explicação do teste

As infecções respiratórias virais são uma das principais causas de hospitalizações e visitas clínicas de crianças e idosos.<sup>(1-6)</sup> Além dos vírus respiratórios conhecidos como influenza e SARS-CoV-2, adenovirus, bocavirus, enterovirus, parechovirus e rinovirus podem causar infecções do trato respiratório.

O grupo de vírus Adenovírus Humano (HAdVs) pertence à família Adenoviridae e ao gênero Mastadenovirus. São vírus de DNA em forma de icosaedro, não envelopados, de dupla cadeia com diâmetro de 65 a 110 nm. Eles estão divididos em sete espécies, (A a G), que compreendem cerca de 67 serotipos.<sup>(7,8)</sup>

Os vírus do grupo bocavirus humanos (HBoV) são icosaédricos, pequenos parvovirus não envelopados.<sup>(9-11)</sup> Possuem cerca de 18 nm a 26 nm de diâmetro e DNA de cadeia única com um genoma de 4 kb a 6 kb (e sequências terminais de 32 a 52 nucleotídeos). A definição dos HBoV como passageiros inofensivos ainda é um debate controverso, pois eles são frequentemente isolados em combinação com outros patógenos. O grupo de HBoV abrange quatro subtipos: HBoV1, HBoV2, HBoV3 e HBoV4.<sup>(9,10)</sup>

Enterovirus e rinovirus são vírus RNA de cadeia única, icosaédricos e não envelopados que apresentam um genoma de cerca de 7,2 kb.<sup>(12-15)</sup> Antes da introdução de ferramentas moleculares para classificar patógenos, os rinovirus e enterovirus eram considerados dois patógenos muito diferentes.<sup>(15)</sup> Hoje, sabemos que estão geneticamente relacionados um ao outro. Ambos pertencem ao genus enterovirus da família Picornaviridae.<sup>(13-17)</sup> Os enterovirus humanos (HEV) compreendem quatro espécies, HEV-A, HEV-B, HEV-C e HEV-D, com mais de 200 serótipos diferentes. Os rinovirus são divididos em três espécies, rinovirus A, rinovirus B e rinovirus C, que compreendem cerca de 150 tipos diferentes.<sup>(12-18)</sup> Como os enterovirus e rinovirus, os parechovirus humanos (HPeV) pertencem à

família Picornaviridae, mas são classificados sob o genus Parechovirus.<sup>(16,17,19-22)</sup> Os HPeV são vírus de RNA de cadeia única e não envelopados. Os HPeV compreendem 19 genótipos (HPeV1 a HPeV19), enquanto o HPeV1 e o HPeV3 são os mais comuns.<sup>(19,20)</sup>

Infecções por HAdV que afetam o trato respiratório são relatadas com sintomas comuns de resfriado, incluindo febre, dor de garganta, vômitos e diarreia, e infecções graves são relatadas com conjuntivite e inflamação pulmonar.<sup>(3,7,8)</sup>

Infecções por HBoV provocam chiado e tosse como sintomas comuns. Ambos os vírus estão presentes em todo o mundo e ocorrem ao longo do ano, enquanto o HBoV atinge seu pico no inverno e na primavera.<sup>(8,9)</sup>

Os sintomas relatados de infecções do trato respiratório do HVE incluem tosse, falta de ar, chiado e febre.<sup>(14)</sup> As infecções por HVE são mais comuns no verão e no outono em climas temperados e ocorrem durante todo o ano em regiões tropicais.<sup>(13)</sup> Os rinovirus estão presentes em todo o mundo, com maior prevalência na primavera e no outono.<sup>(12,15)</sup> Eles ocorrem normalmente em pacientes com pneumonia, bronquiolite ou infecção do ouvido médio e podem ocorrer com ou sem copatógenos. Os rinovirus causam sintomas como rinorreia, dor de garganta, tosse, dor de cabeça, congestão nasal e mal-estar.<sup>(15)</sup> Os sintomas comuns de uma infecção por HPeV são os mesmos sintomas de um resfriado, como nariz entupido e febre, bem como tosse.<sup>(20,21,23)</sup>

Normalmente as infecções respiratórias virais provocadas por esses vírus são limitadas ou assintomáticas, mas especialmente crianças, idosos e pacientes com imunodeficiência podem ser afetados por doenças graves.<sup>(7-9,14-16,19,22)</sup>

### 3. Princípio do teste

O teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel é um teste RT-PCR multiplex em tempo real para a detecção quantitativa e diferenciação direta de RNA de rinovirus/enterovirus/parechovirus, DNA de bocavirus e DNA de adenovirus esfregaços nasais/garganta humana.

Após o isolamento do DNA, (se presente) os fragmentos de genes específicos de rinovirus/enterovirus/parechovirus (5'UTR), bocavirus (5'NTR) e adenovirus (hexon) são amplificados. As sequências-alvo amplificadas são detectadas usando sondas de hidrólise que são etiquetadas com um supressor em uma extremidade e um corante de repórter fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridizam com o amplicon na presença de uma sequência alvo. Durante a extensão, a **Taq-Polymerase** separa o indicador do silenciador. O indicador emite um sinal fluorescente detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de amplicons formados. O teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel contém **Internal Control RNA** para conseguir controlar o preparo da amostra e/ou qualquer potencial inibição de PCR.

#### 4. Reagentes fornecidos

Os reagentes no kit são suficientes para 100 determinações.

**Tabela 1:** Reagentes fornecidos

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µL	amarelo, pronto para utilização
2	Enzyme Mix	1 ×	80 µL	vermelho, pronto para utilização
R	Internal Control RNA	2 ×	1700 µL	marrom, pronto para utilização
N	No Template Control	1 ×	450 µL	branco, pronto para utilização
P	Positive Control	1 ×	200 µL	azul, pronto para utilização

#### 5. Instruções de armazenamento

- Siga as orientações de manuseio da Tabela 2 e armazene o kit diretamente após a utilização, conforme as informações especificadas.
- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz a -20 °C e, caso não abertos, podem ser utilizados até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término da data de validade.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 °C - 8 °C).
- O congelamento e descongelamento repetido até 20 vezes não afeta a propriedade do teste (se necessário, divida em porções após o primeiro descongelamento e congele os reagentes imediatamente).
- Descongele todos os reagentes adequadamente durante a preparação do PCR (2 °C - 8 °C).

**Tabela 2:** Condições e informações de armazenamento

	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento
fechado	-20 °C	Pode ser usado até a data de validade impressa
aberto	-20 °C	20 ciclos de congelamento e descongelamento

## 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

### 6.1 Reagentes

Nenhum.

### 6.2 Equipamentos de laboratório

Os seguintes equipamentos são necessários para realizar o teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel:

Equipamentos
Plataforma de extração: Instrumento MagNA Pure 96 (Roche)
Instrumento de PCR em tempo real: LightCycler® 480 II (Roche)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm)
Consumíveis para PCR em tempo real (placas (perfil baixo, poços brancos, armação transparente), tubos de reação, filmes adesivos)
Centrífuga com rotor para placas
Vortexer
Pipetas (0,5 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)
Pontas de pipeta com filtros
Luvras descartáveis sem pó

Para questionamentos sobre o uso de equipamentos para processamento automatizado, entre em contato com a R-Biopharm AG através do e-mail [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

## 7. Avisos e precauções para os usuários

Apenas para uso em Diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório qualificado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas.

Ao realizar este teste, sempre siga estritamente o manual de operação.

Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com pele lesionada e membranas mucosas.

Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.

Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas.

Salas separadas, vestuário especial e instrumentos para extração, preparação de PCR e de análise de PCR devem ser utilizados para evitar a contaminação cruzada e resultados falso-positivos.

Evite contaminar as amostras e componentes do kit com micróbios e nucleases (DNase/RNase).

As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.

Não troque ou combine os componentes (Reaction Mix, Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, No Template Control) de um lote de um kit com os componentes de outro lote.

Não use o kit após o prazo de validade. Os usuários são responsáveis por descartar adequadamente todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

Mais detalhes sobre as Folhas de Dados de Segurança (Safety Data Sheets, SDS) podem ser encontrados sob o número do item em <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para usuários na União Europeia: Comunicar todos os eventos adversos graves associados ao produto à R-Biopharm AG e às autoridades nacionais competentes.

## 8. Coleta e armazenamento de amostras

### 8.1 Preparação de DNA/RNA de esfregaços nasais e da garganta

Para a preparação de DNA/RNA a partir de esfregaços nasais e de garganta, recomenda-se o kit MagNA Pure 96 DNA/Viral NA SV no equipamento MagNA Pure 96 (Roche). Para isso, use o protocolo Pathogen Universal 200 e elua em 50 µL. As instruções do fabricante devem ser observadas.

O teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel contém **Internal Control RNA** que indica a inibição potencial de PCR, verifica a integridade dos reagentes e confirma a extração bem sucedida do ácido nucléico. O **Internal Control RNA** pode ser utilizado apenas como um controle de inibição ou como um controle de processo (extração e controle de inibição).

Quando o **Internal Control RNA** é usado apenas como controle de inibição para amplificação, 1 µL do **Internal Control RNA** deve ser adicionado ao Master Mix (ver Tabela 4).

Quando o **Internal Control RNA** é usado como controle de extração para o preparo da amostra e como um controle de inibição para amplificação, então 20 µL do **Internal Control RNA** devem ser usados durante a extração. Se possível, é recomendado adicionar o Internal Control RNA ao cartucho da amostra antes de adicionar a amostra. É recomendado pipetar 1 µL do **Internal Control RNA** por reação à mistura de PCR do controle negativo e do controle positivo.

## 9. Realização do teste

### 9.1 Preparação do Master Mix

O número total de reações necessárias para a PCR (amostras e reações de controle) deve ser calculado. Em cada teste realizado, devem ser incluídos um controle positivo e um controle negativo.

Recomenda-se acrescentar um volume adicional de 10 % ao Master Mix para compensar qualquer perda de pipetagem (ver Tabela 3 e Tabela 4). Antes de utilizar, descongele o **Reaction Mix**, o **Enzyme Mix**, o **Positive Control**, o **No Template Control** e o **Internal Control RNA**, misture bem (exceto o Enzyme Mix) e centrifugue por um curto período de tempo. Os reagentes devem ser sempre resfriados adequadamente durante as etapas de trabalho (2 °C - 8 °C).

**Tabela 3:** Exemplo de cálculo e preparação do Master Mix para 10 reações (ICR como controle de extração e inibição)

Código do kit	Componentes do Master Mix	Quantidade por reação	10 reações (mais 10%)
1	Reaction Mix	19,3 µL	212,3 µL
2	Enzyme Mix	0,7 µL	7,7 µL
	<b>Total</b>	<b>20 µL</b>	<b>220 µL</b>

Misture o Master Mix e depois centrifugue por pouco tempo.

**Tabela 4:** Exemplo do cálculo e preparação do Master Mix para dez 10 reações (ICR apenas como controle de inibição)

Código do kit	Componentes do Master Mix	Quantidade por reação	10 reações (mais 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
	<b>Total</b>	<b>21,0 µL</b>	<b>231,0 µL</b>

Misture o Master Mix e depois centrifugue por pouco tempo.

## 9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µl do Master Mix em cada tubo de reação (placas).

**Controle negativo:** Adicione 5 µl do **No Template Control** a cada Master Mix pré-pipetado.

**Observação:** Se o **Internal Control RNA** é usado como controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, é recomendado adicionar 1 µL do **Internal Control RNA** a cada mistura de PCR do controle negativo.

**Amostras:** Adicione 5 µL eluído a cada Master Mix pré-pipetado.

**Controle positivo:** Adicione 5 µL de **Positive Control** a cada Master Mix pré-pipetado.

**Observação:** Se o **Internal Control RNA** é usado como controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, recomendamos adicionar 1 µL do **Internal Control RNA** a cada mistura de PCR do controle positivo.

Sele as placas, centrifugue brevemente em velocidade lenta e transfira para o instrumento de PCR em tempo real. Inicie o PCR de acordo com a configuração do instrumento de PCR (ver Tabela 5 e Tabela 6).

## 9.3 Configuração do instrumento de PCR

### 9.3.1 Perfil de PCR em tempo real universal

Para harmonizar os ensaios RIDA®GENE, o ensaio RIDA®GENE Pediatric Viral Panel foi verificado em perfil universal. Isto torna possível combinar os ensaios de DNA e RNA um com o outro.

**Tabela 5:** Perfil de PCR em tempo real universal para o LightCycler® 480 II

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
Desnaturação <u>PCR</u>	10 s, 95 °C
Anelamento/extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ tempo de subida	Tempo máximo

**Observação:** O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

## 9.4 Configuração do canal de detecção

**Tabela 6:** Seleção dos canais de detecção adequados

Instrumento de PCR em tempo real	Deteção	Canal de deteção	Comentário
Roche LightCycler® 480 II	Rinovirus/ enterovirus/ parechovirus	465/510	É necessário o RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
	Bocavirus	533/610	
	Adenovirus	618/660	

## 10. Controle de qualidade – indicação de instabilidade ou validade de reagentes

As amostras são avaliadas usando o software de análise do instrumento de PCR em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante. Os controles negativos e positivos devem apresentar os resultados corretos (ver Tabela 7).

O **Positive Control** está presente em uma concentração de  $10^3$  cópias/ $\mu$ L. É usado em uma quantidade total de  $5 \times 10^3$  cópias em cada execução de PCR.

**Tabela 7:** Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

Amostra	Resultado	ICR Ct	Gene alvo Ct
Controle positivo	Positivo	N/A *1	Ver Certificado de Análise
Controle negativo	Negativo	Ct > 20	0

\*1 Um valor de Ct para o ICR não é necessário para obter um resultado positivo do controle positivo.

Se o controle positivo não estiver na faixa Ct especificada, mas o controle negativo for válido, todas as reações precisam ser reanalisadas, incluindo os controles.

Se o controle negativo não for negativo, mas o controle positivo for válido, todas as reações precisam ser reanalisadas, incluindo os controles.

Se os valores especificados não forem atingidos, verifique os seguintes itens antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo utilizado
- Execução correta do teste

Se as condições ainda não tiverem sido cumpridas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor R-Biopharm local.

## 11. Interpretação dos resultados

**Tabela 8:** Interpretação dos resultados\*

Detecção de				
Rinovirus/enterovirus/parechovirus	Bocavirus	Adenovirus	ICR	Resultado
+	-	-	+/-	Rinovirus/enterovirus/parechovirus detectáveis
-	+	-	+/-	Bocavirus detectável
-	-	+	+/-	Adenovirus detectável
+	+	-	+/-	Rinovirus/enterovirus/parechovirus e bocavirus detectáveis
+	-	+	+/-	Rinovirus/enterovirus/parechovirus e adenovirus detectáveis
-	+	+	+/-	Bocavirus e adenovirus detectáveis
+	+	+	+/-	Rinovirus/enterovirus/parechovirus; bocavirus e adenovirus detectáveis
-	-	-	+	Genes alvo não detectáveis
-	-	-	-	Inválido

\* + = positivo  
- = negativo

Uma amostra é positiva caso a amostra e o **Internal Control RNA** apresentem um sinal de amplificação no sistema de detecção.

A amostra também é positiva se o RNA da amostra mostrar um sinal de amplificação, mas nenhum sinal de amplificação puder ser visto para o **Internal Control RNA** no sistema de detecção. A detecção do **Internal Control RNA** não é necessária neste caso, porque as altas concentrações de fragmentos amplificados podem causar um sinal fraco ou ausente do **Internal Control RNA**.

Uma amostra é negativa se o RNA da amostra não mostrar um sinal de amplificação, mas um sinal de amplificação for visível para o **Internal Control RNA** no sistema de detecção. A inibição da reação de PCR pode ser excluída através da detecção do **Internal Control RNA**.

Uma amostra é inválida se o RNA da amostra e o **Internal Control RNA** não mostrarem um sinal de amplificação no sistema de detecção. Os inibidores de PCR estão presentes na amostra ou ocorreu um erro durante o processo de extração.

## 12. Limitações do método

1. O teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel detecta RNA de rinovirus/enterovirus/parechovirus, DNA de bocavirus, e DNA de adenovirus em esfregaços nasais/garganta humana não tratados. Uma conexão entre o nível do valor Ct determinado e a ocorrência de sintomas clínicos graves não pode ser derivada disso. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com os sintomas clínicos como um todo.
2. O diagnóstico não deve ser baseado apenas no resultado da análise biológica molecular, mas deve sempre levar em conta o histórico médico e os sintomas do paciente.
3. Este teste é validado apenas a esfregaços nasais/garganta.
4. A amostragem, transporte, armazenamento e manuseio inadequados ou uma carga patogênica abaixo da sensibilidade analítica do teste podem levar a resultados falso-negativos.
5. A presença de inibidores de PCR pode levar a resultados falso-negativos ou inválidos.
6. Como em todos os testes de diagnóstico *in vitro* baseados em PCR, concentrações extremamente baixas das sequências alvo que estão abaixo do limite de detecção (LoD 95 %) podem ser detectadas. Os resultados obtidos nem sempre são reproduzíveis.
7. Mutações ou polimorfismos nos locais de ligação do iniciador ou da sonda podem interferir na detecção de variantes novas ou desconhecidas e podem levar a resultados falso-negativos usando o RIDA®GENE Pediatric Viral Panel.
8. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Um resultado positivo indica que os genes alvo (rinovirus/enterovirus/parechovirus (5'UTR), bocavirus (5'NTR) e adenovirus (hexon)) estão presentes.
9. As substâncias dipropionato de beclometasona e di-hidrocodeína podem ter propriedades interferentes mesmo em pequenas quantidades. A partir de uma concentração de 5% [v/v], ratioAllerg® 50 µg (dipropionato de beclometasona) tem um efeito interferente na detecção do adenovirus. Gotas de Paracodin® N (di-hidrocodeína) produzem um efeito interferente na detecção de enterovirus/rinovirus/parechovirus e na detecção do IC a partir da menor concentração testada de 3,0 % [v/v].
10. Este ensaio deve ser realizado em conformidade com o regulamento sobre Boas Práticas Laboratoriais (BPL). Os usuários devem seguir precisamente as instruções do fabricante ao realizar o teste.

## 13. Características de desempenho

### 13.1 Características de desempenho clínico

#### 13.1.1 Limite de detecção do dispositivo

Para determinar o limite de detecção do dispositivo, 20 replicações de uma amostra de controle (50 cópias/reação) (rinovirus/enterovirus/parechovirus, bocavirus, adenovirus)) foram medidas no LightCycler® 480 II. Todas as replicações foram positivas.

O limite de detecção do dispositivo é, portanto, de 50 cópias/reação.

#### 13.1.3 Especificidade analítica

##### Substâncias interferentes

A presença de inibidores de PCR e de substâncias interferentes pode levar a resultados falso-negativos ou inválidos. Portanto, os efeitos de várias substâncias que poderiam estar presentes devido ao seu amplo uso em infecções no trato respiratório ou ocorrência generalizada nas amostras de cultura de nasofaringe ou orofaringe foram investigadas.

As substâncias que poderiam potencialmente influenciar significativamente os resultados do teste foram examinadas inicialmente em altas concentrações (o triplo da dose diária ou simulação do pior caso) em uma tela de interferência. Se uma potencial interferência foi encontrada nesta tela de interferência para uma substância examinada, foi estabelecida uma relação dose-efeito entre a concentração da substância em questão e a interferência.

Não foi encontrada nenhuma interferência para as substâncias listadas na Tabela 10.

**Tabela 10:** Substâncias potencialmente interferentes

Substância potencialmente interferente	Concentração
Comprimidos revestidos por película de Amoxicilina ratiopharm® 1000 mg (amoxicilina)	1 mg/mL
Comprimidos revestidos por película de Azitromicina ratiopharm® 500 mg (azitromicina)	84 mg/mL
Sangue humano	2 % [v/v]
Mucinas	60 µg/mL
Spray nasal Nasenspray ratiopharm® (xilometazolina)	10 % [v/v]
Cloreto de sódio	10 % [v/v]
Spray Neo-angin® (cloridrato de benzidamina)	10 % [v/v]
Fosfato de oseltamivir	25 mg/mL
Comprimidos 500 mg Paracetamol ratiopharm® (paracetamol)	10 mg/mL

Foram observados efeitos inibidores para as substâncias ratioAllerg® 50 µg (dipropionato de beclometasona) (5 % [v/v]) e gotas de Paracodin® N (di-hidrocodeína) (3,0 % [v/v]) (ver Limitações do método).

### Reatividade cruzada

Foram investigados vários organismos (bactérias, vírus, fungos) que são comumente encontrados na matriz de esfregaços nasais/gargantas. Os microorganismos a serem investigados para este ensaio foram escolhidos porque ou eles ocorrem naturalmente na matriz de cultura ou causam sintomas correspondentes como patógenos respiratórios. Para as análises foram usadas culturas bacterianas (entre 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> UFC\*/mL), culturas fúngicas ou virais, sobrenadantes de culturas bacterianas, virais ou fúngicas e padrões LGC e NIBSC dos organismos em particular.

O RIDA®GENE Pediatric Viral Panel multiplex real-time RT-PCR é específico para rinovírus/enterovírus/parechovírus, bocavírus e adenovírus. Não foram detectadas reatividades cruzadas para as seguintes espécies (consulte a Tabela 11):

**Tabela 11:** Organismos com potencialmente reatividade cruzada

Organismo	Resultado do teste*		
	Rinovírus/enterovírus/parechovírus	Bocavírus	Adenovírus
<i>Acinetobacter baumannii</i> estirpe 5377	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-
<i>Bordetella parapertussis</i> estirpe 12822	-	-	-
<i>Bordetella pertussis</i> estirpe Tohama 1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	-	-
Vírus Epstein-Barr, estirpe B95-8	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	-	-
Vírus Herpes Simplex 1, estirpe McIntyre	-	-	-
Vírus Herpes Simplex 2, estirpe MS	-	-	-
Coronavírus humano 229E	-	-	-
Coronavírus humano OC43	-	-	-

Coronavírus humano SARS-CoV-2 (isolado: Itália-INMI1)	-	-	-
MERS-CoV estirpe: Flórida/EUA-2 Arábia Saudita 2014	-	-	-
Citomegalovírus humano	-	-	-
Metapneumovírus humano	-	-	-
Vírus parainfluenza humana 1, estirpe C35	-	-	-
Vírus parainfluenza humana 2, estirpe Greer	-	-	-
Vírus parainfluenza sorotipo 3	-	-	-
Vírus parainfluenza 4a, estirpe M-25	-	-	-
Vírus sincicial respiratório humano, estirpe longa	-	-	-
Vírus sincicial respiratório humano, estirpe 9320	-	-	-
Influenza A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)	-	-	-
Influenza A/Victoria/2570/2019 (H1N1)	-	-	-
Influenza B/Washington/02/2019	-	-	-
Influenza B/Phuket/3073/2013 (linhagem Yamagata)	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> estirpe MGH 78578	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> subespécie <i>pneumophila</i>	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> estirpe FH de Agente de Eaton	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> estirpe 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> estirpe NCTC 7465	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	-	-

- = negativo

### 13.1.4 Precisão

A precisão do teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR foi determinada para os seguintes níveis de consideração.

Precisão *Intraensaio*: Determinação de cinco amostras de controle usando 20 replicações, cada uma no LightCycler® 480 II sob condições idênticas.

Precisão *Interensaio*: Determinação de cinco amostras de controle em 20 execuções em duplicidade em dez dias de trabalho (duas execuções por dia) realizadas por dois técnicos diferentes em condições reproduzíveis.

Os testes de precisão *intra* e *interensaio* foram realizados utilizando três lotes diferentes.

Os dados de precisão foram obtidos utilizando cinco amostras de controle, bem como o PTC e o NTC pertencentes ao ensaio.

O coeficiente de variação máximo obtido das medições com o teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR no LightCycler® 480 II foi de 3,16 %.

**Tabela 12:** Resultados da precisão do teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para rinovirus/enterovirus/parechovirus.

Valor médio Ct/CV	<i>Intraensaio</i>			<i>Interensaio</i>			<i>Interlote</i>	
	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit	
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
	CV (%)	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	31,8
	CV (%)	1,11 %	1,49 %	0,75 %	2,09 %	2,43 %	2,06 %	2,23 %
3	Ct	32,0	31,9	31,8	33,3	32,8	33,0	33,0
	CV (%)	1,22 %	1,29 %	1,19 %	2,04 %	2,50 %	1,91 %	2,26 %
4	Ct	22,8	22,8	22,5	23,9	23,7	23,7	23,8
	CV (%)	1,12 %	0,96 %	0,91 %	2,87 %	3,16 %	2,45 %	2,84 %
5	Ct	26,1	25,9	26,2	27,2	26,9	27,0	27,1
	CV (%)	0,83 %	0,83 %	0,78 %	2,12 %	2,00 %	2,19 %	2,13 %

**Tabela 13:** Resultados da precisão do teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para bocavirus.

Valor médio Ct/CV	<i>Intraensaio</i>			<i>Interensaio</i>			<i>Interlote</i>
	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	CV (%)	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
	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 %

**Tabela 14:** Resultados da precisão do teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel para adenovirus.

Valor médio Ct/CV	<i>Intraensaio</i>			<i>Interensaio</i>			<i>Interlote</i>	
	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do kit	
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
	CV (%)	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
	CV (%)	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
	CV (%)	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
	CV (%)	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
	CV (%)	0,93 %	0,83 %	0,68 %	1,85 %	1,65 %	1,23 %	1,62 %

### 13.1.5 Reatividade analítica

A reatividade do teste RIDA®GENE Pediatric Viral Panel real-time RT-PCR foi examinada em um painel definido de estirpes/subtipos (consultar a Tabela 15).

**Tabela 15:** Testes de reatividade analítica

Estirpe	Concentração	Resultado*		
		Rinovirus/ enterovirus/ parechovirus	Bocavirus	Adenovirus
Adenovirus 1, humano, estirpe Adenoid 71 (subgrupo C)	1 x 10 <sup>-5</sup> µg/mL	-	-	+
Adenovirus 40, humano, estirpe Dugan (subgrupo F)	1,26 U/mL	-	-	+
Adenovirus 41, humano, estirpe Talk (subgrupo F)	1,17 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adenovirus tipo 2 (subgrupo C)	8,51 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	-	-	+
Adenovirus tipo 3 (subgrupo B)	1 x 10 <sup>3,23</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 4 (subgrupo E)	1,41 U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 11 (subgrupo B)	1 x 10 <sup>0,29</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 31 (subgrupo A)	1 x 10 <sup>0,15</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus tipo 37 (subgrupo D)	1 x 10 <sup>-1,98</sup> U/mL	-	-	+
Adenovirus estirpe tipo 5 N/A (subgrupo C)	1:100	-	-	+
Adenovirus tipo 7A (subgrupo B)	1 x 10 <sup>3,06</sup> U/mL	-	-	+
Bocavirus, HBoV1	1:10 <sup>6</sup>	-	+	-
Enterovirus A - Coxsackievirus A2 estirpe Fleetwood	1,51 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus A - enterovirus tipo 71 cepa 2003 isolada	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, estirpe Kuykendall	1 x 10 <sup>3,29</sup> U/mL	+	-	-
Enterovirus C - coxsackievirus A24, estirpe DN-19	1:10 <sup>4</sup>	+	-	-
Enterovirus D - enterovirus tipo 68, estirpe 2007 isolada	1,26 x 10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Enterovirus D - enterovirus tipo 70, estirpe J670/71	1:10 <sup>5</sup>	+	-	-
Parechovirus tipo 1, estirpe 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	+	-	-
Rinovirus tipo 1A	4,17 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Rinovirus A16	1,26 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Rinovirus A80	1,17 x 10 <sup>1</sup> U/mL	+	-	-
Rinovirus B14	1,05 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	+	-	-
Rinovirus B42	2,45 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-
Rinovirus B70	1,70 x 10 <sup>2</sup> U/mL	+	-	-

\*+ = positivo (pelo menos 2 de 3 replicações positivas)

- = negativo

#### 14. Histórico de versões

Número da versão	Seção e designação
2022-03-03	Versão da edição

## 15. Explicação de símbolos

### Símbolos gerais

	Para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consulte o manual de operação
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de armazenamento
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

### Símbolos específicos do teste

	Reaction Mix
	Enzyme Mix
	Controle de extração/inibição
	Controle negativo
	Controle positivo

## 16. Referências

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