

RIDA® GENE Flu

REF PG0505



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Der RIDA®GENE Flu Test, der auf dem Roche LightCycler® 480II durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und Differenzierung von Influenzaviren (Influenza A, Influenza B und H1N1v) RNA aus unbehandelten humanen Nasen-/Rachenabstrichen von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer akuten respiratorischen Infektion.

Der RIDA®GENE Flu Test ist zur Unterstützung der Differentialdiagnose von Influenzavirus-Infektionen bei Patienten mit Symptomen einer respiratorischen Infektion in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen.

Negative Ergebnisse schließen eine Influenzavirus-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden.

Das Produkt ist für den Einsatz durch Fachanwender in Krankenhauslaboren, Referenzlaboren, Privatlaboren oder staatlichen Laboren vorgesehen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Die Influenza, auch Grippe genannt, gehört zu den bedeutendsten respiratorischen Infektionskrankheiten, und wird durch Influenzaviren ausgelöst.

Weltweit erkranken 3 - 5 Millionen Menschen jährlich an Influenza und ca. 290.000 - 650.000 sterben an der Erkrankung. Die jährlichen Influenzaepidemien können schwerwiegende Auswirkungen auf das Gesundheitswesen und die Wirtschaft haben.¹

In der Saison 2018/19 wurde die Zahl der Influenza-bedingten Arztbesuche in Deutschland auf etwa 3,8 Millionen geschätzt. Die Anzahl der Influenza-bedingten Krankenhauseinweisungen aus primärversorgenden Praxen betrug schätzungsweise 18.000 Fälle.²

Die Arbeitsgemeinschaft Influenza (AGI) des Robert Koch Instituts schätzt pro Jahr zwischen einer und sieben Millionen Influenza-bedingte Arztbesuche. Bei einer schweren Grippewelle wie in der Saison 2012/2013 und 2017/18 wurden rund 30.000 Influenza-bedingte Krankenhauseinweisungen und 20.000-25.000 Todesfälle geschätzt, während in milden Saisons (wie z.B. 2013/2014) nur rund 3.000 Krankenhauseinweisungen geschätzt werden und eine Influenza-assoziierte Übersterblichkeit (Exzess-Mortalität) nicht nachzuweisen ist.^{2,3}

Influenzaviren sind RNA Viren, die zur Familie der Orthomyxoviridae gehören und in die Subtypen A, B und C unterteilt werden. Charakteristisch für Influenzaviren ist ihre mutationsbedingte hohe Variabilität (Antigendrift) der Hüllenantigene Hämagglutinin (HA) und Neuramidase (NA). Die Influenza Typen A und B verursachen die jährlich auftretenden Grippeepidemien, während Infektionen mit den Influenza C Viren nur milde Erkrankungen verursachen.

Epidemiologisch spielen Influenza A Viren aufgrund ihrer Diversität die größte Rolle: Sie sind verantwortlich für drei Pandemien im 20. Jahrhundert sowie für die Mehrzahl

der Grippeepidemien. Die Mehrzahl der Influenza A Infektionen beim Menschen werden durch die Subtypen H1N1 und H3N2 hervorgerufen. Neben der mutationsbedingten Antigendrift können durch Durchmischung eines humanen und nichthumanen Influenza A Stamms neue Influenza A Subtypen (Antigen shift) entstehen, die eine Pandemie auslösen können. Der Influenza A-Subtyp H1N1 steht im Zusammenhang mit vergangenen und potentiellen neuen Grippe-Pandemien (z.B. Spanische Grippe 1918/19; Schweinegrippe 2009). Heute wird dieser Influenza A Subtyp als H1N1v bezeichnet. Die Übertragung von Influenzaviren erfolgt durch Tröpfchen und Aerosole. Die Inkubationszeit beträgt 1 - 4 Tage. Klinische Symptome sind schwere Erkrankungen hauptsächlich des respiratorischen Traktes mit hohem Fieber und Husten. Charakteristisch ist ein abrupter Symptombeginn (Sudden Onset). Bei schweren Krankheitsverläufen können Pneumonien und bakterielle Superinfektionen auftreten, die vor allem bei alten Menschen und Kindern tödlich enden können.⁴

3. Testprinzip

Der RIDA[®]GENE Flu Test ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Influenzaviren (Influenza A, Influenza B sowie Influenza A Subtyp H1N1v). Der Nachweis erfolgt im One-Step real-time RT-PCR Format, d.h. die reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA wird dabei mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die für Influenza A (M-Protein-Gen), Influenza B (NP-Gen) und Influenza A Subtyp H1N1v (H1-Gen) spezifischen Genfragmente werden anschließend mittels real-time RT-PCR 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 Flu Test enthält eine Internal Control RNA (ICR), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Enzyme-Mix	1x	80 µl	rot
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	braun
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- 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 Testeigenschaften 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).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE Flu multiplex real-time RT-PCR wurde mit folgender Extraktionsplattform und real-time PCR-Gerät Kombination verifiziert:

Tab.2a: Benötigtes Zubehör (verifiziert)

Extraktionsplattform	
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 480II

Des Weiteren ist der RIDA®GENE Flu multiplex real-time RT-PCR Test kompatibel für die Verwendung mit folgender Extraktionsplattform und real-time PCR-Geräten:

Tab. 2b: Benötigtes Zubehör (kompatibel)

Extraktionsplattform	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Real-time PCR-Geräte	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- Sterile Abstrichtupfer (z.B. eSwab® Amies-Medium, Copan Diagnostic Inc.)
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-frei)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

- Dieser Test ist nur von geschultem 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 von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- 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 siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 RNA-Präparation aus Nasen- und Rachenabstrichen

Für die RNA-Präparation aus Abstrichen wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen die vom Hersteller geforderte Menge an Medium in die Nukleinsäureextraktion des Nukleinsäure-Extraktionskits oder Nukleinsäure-Extraktionssystems einzusetzen und laut Herstellerangabe durchführen.

Der RIDA®GENE Flu 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 Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control RNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control RNA dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 3).

Wird die **Internal Control RNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control RNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control RNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control RNA** zum RT-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, durchmischen (ausgenommen Enzyme Mix) und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet 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 (Gefäße/Platten) pipettieren.

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

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

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

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 Universal real-time PCR-Profil

Tab. 5: Universal real-time PCR Profil für LightCycler® Serie und RIDA®CYCLER

<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.

Tab. 6: Universal real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

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

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil kann auch für DNA-Tests verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR-Tests in einem Lauf kombiniert werden.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 7: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Hinweis
R-Biopharm RIDA®CYCLER	H1N1v	Green	-
	ICR	Yellow	
	Influenza B	Orange	
	Influenza A	Red	
Roche LightCycler® 480II	H1N1v	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	533/580	
	Influenza B	533/610	
	Influenza A	618/660	
Agilent Techn. Mx3005P	H1N1v	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICR	HEX	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
ABI 7500 Fast Dx	H1N1v	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	H1N1v	FAM	-
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
Qiagen Rotor- Gene Q	H1N1v	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein.
	ICR	Yellow	
	Influenza B	Orange	
	Influenza A	Red	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8, Abb.1, Abb.2, Abb.3).

Die Positivkontrolle 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. 8: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	Nicht nachweisbar

**¹Ein 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

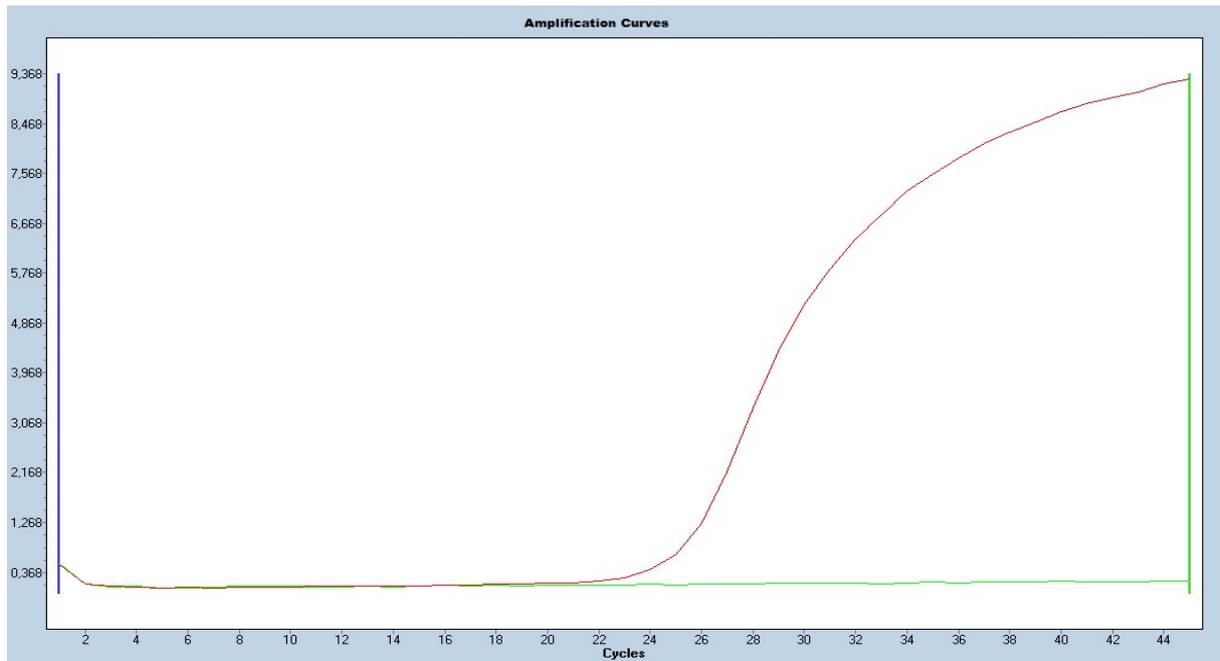


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (H1N1v) auf dem LightCycler® 480II

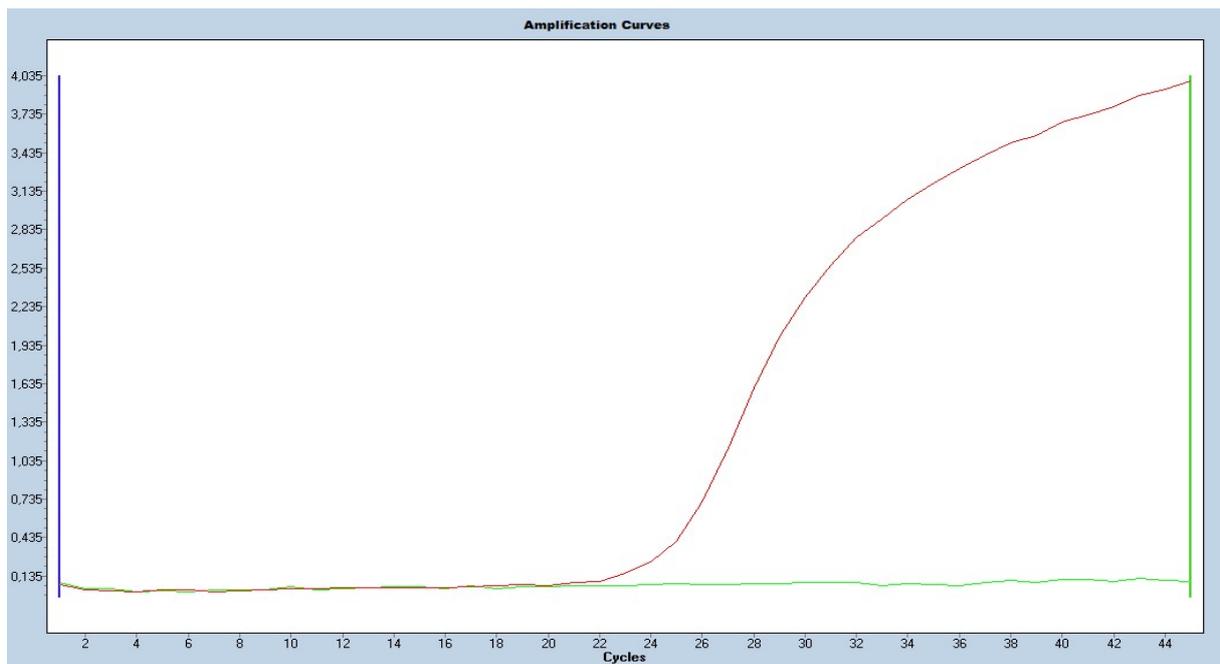


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (Influenza B) auf dem LightCycler® 480II

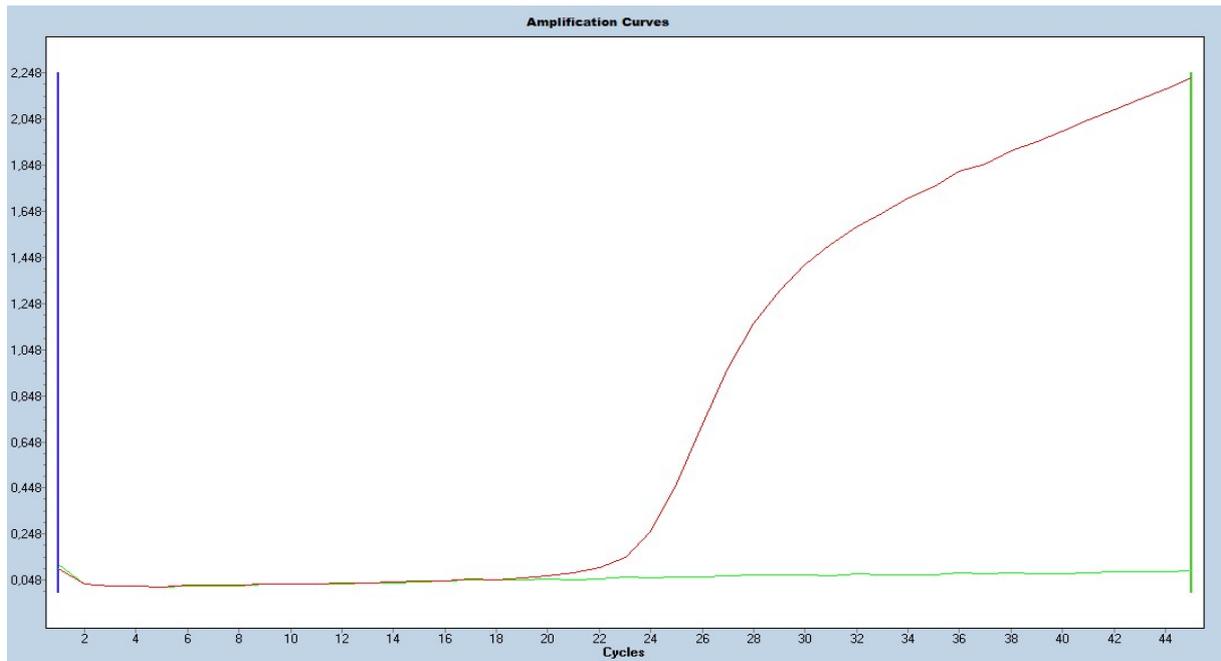


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (Influenza A) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von				
H1N1v	Influenza B	Influenza A	ICR	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv/ negativ	Ungültig*
negativ	positiv	negativ	positiv/ negativ	Influenza B nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/ negativ	Influenza A nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/ negativ	Influenza B nachweisbar, Nachweis für Influenza A H1N1v ungültig*
positiv	negativ	positiv	positiv/ negativ	Influenza A H1N1v nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv/ negativ	Influenza A und Influenza B nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/ negativ	Influenza A H1N1v und Influenza B nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

* Siehe auch Kapitel 12, Punkt 9

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. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Dieser Test ist nur für Nasen- und Rachenabstriche geeignet.
2. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Viruslast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
3. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
4. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE Flu zu falsch negativen Ergebnissen führen
5. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro*-diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
6. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit replikationsfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die entsprechenden Zielgene (H1-Gen, NP-Gen, M-Protein-Gen) vorhanden sind.
7. Dieser Test differenziert nur den Influenza A-Subtyp H1N1v. Andere Influenza-Subtypen werden nicht differenziert.
8. Dieser Test kann nicht zum Nachweis von Influenza-C Viren verwendet werden.
9. Bei einer neueren Variante des H1N1v-Subtyps, die eine Mutation in der Primer- und Sondenbindungsregion für Influenza A aufweist, kann es zu einem positiven Signal im H1N1v-Kanal, aber negativem Signal im Influenza A-Kanal kommen. Dieses Ergebnis kann als positives Ergebnis für Influenza A H1N1v interpretiert werden.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Der RIDA® GENE Flu multiplex real-time RT-PCR Test hat eine Nachweisgrenze von ≥ 50 RNA Kopien/Reaktion für H1N1v, Influenza B und Influenza A.

Die folgenden Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen Verdünnungsreihen von H1N1v, Influenza B und Influenza A. (jeweils $5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ RNA Kopien/Reaktion) auf dem LightCycler® 480II.

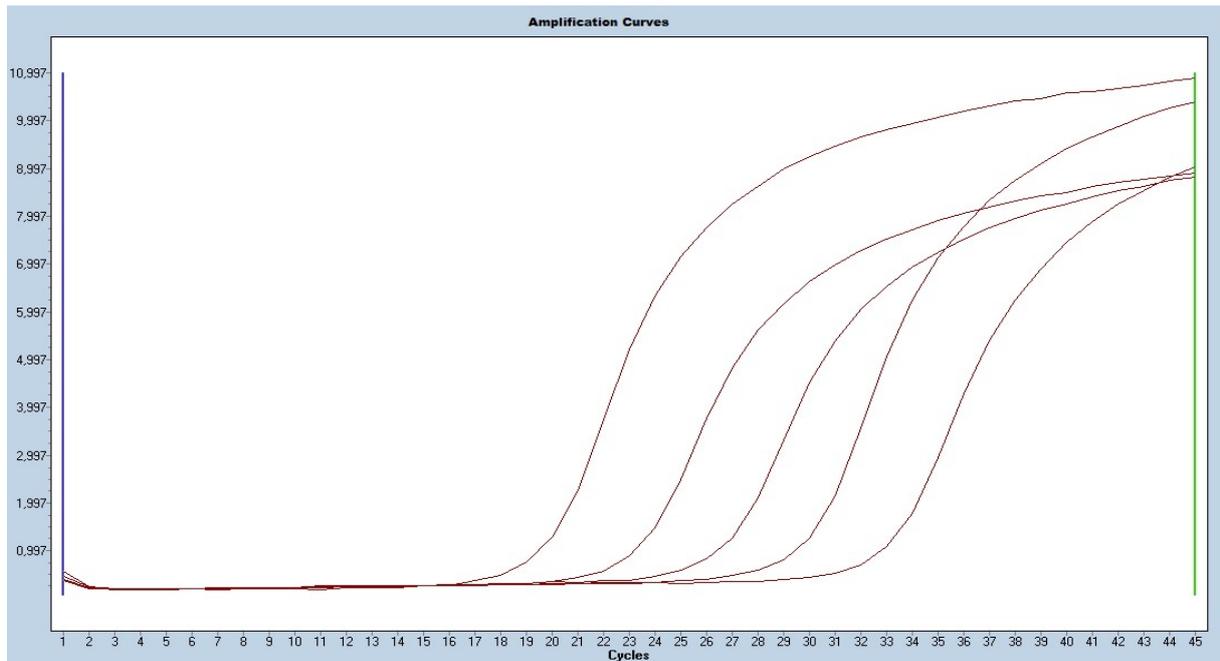


Abb. 4: Verdünnungsreihe H1N1v ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ RNA Kopien/Reaktion) auf dem LightCycler® 480II

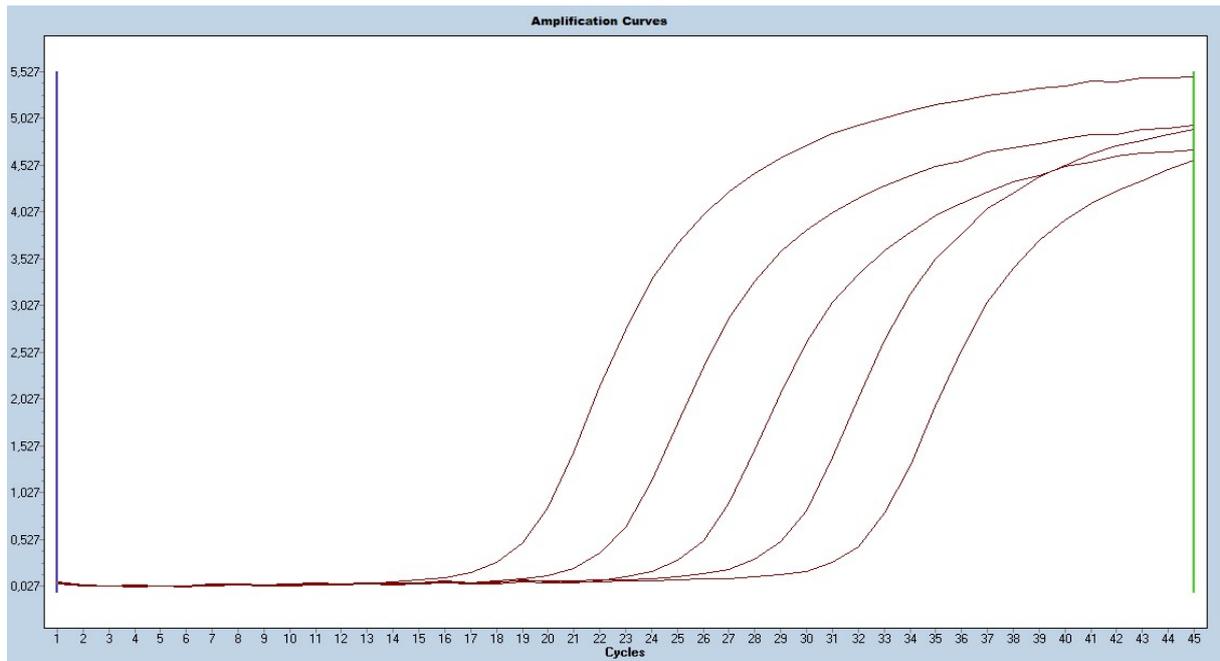


Abb. 5: Verdünnungsreihe Influenza B (5×10^5 – 5×10^1 RNA Kopien/Reaktion) auf dem LightCycler® 480II

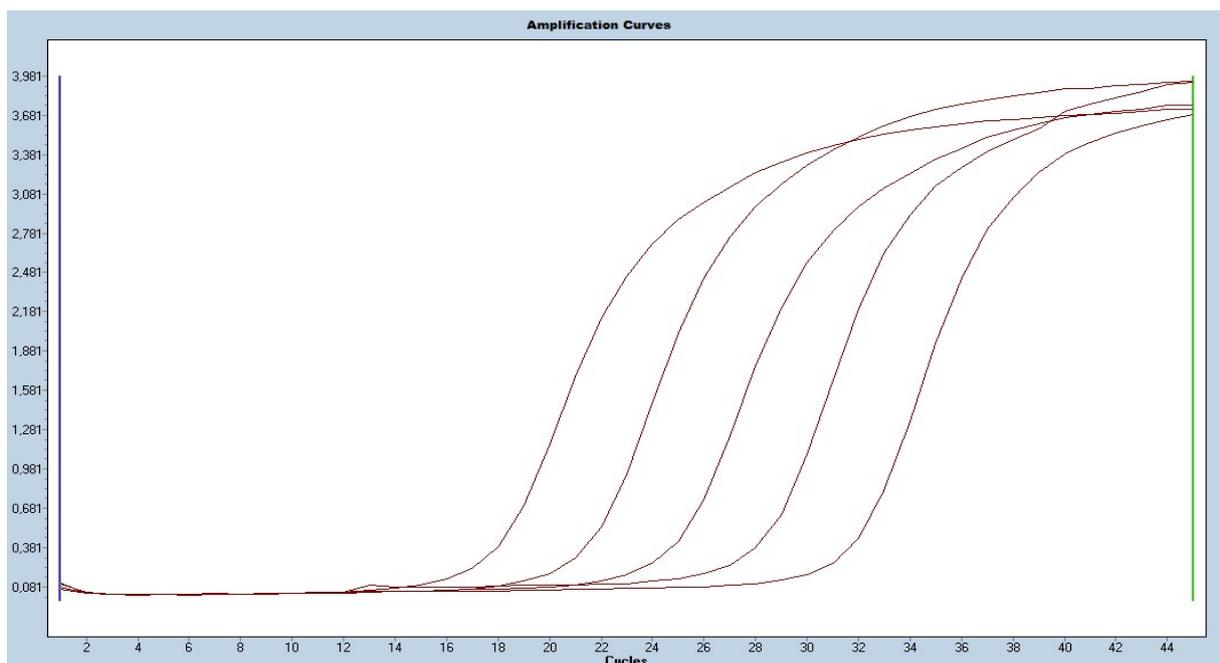


Abb. 6: Verdünnungsreihe Influenza A (5×10^5 – 5×10^1 RNA Kopien/Reaktion) auf dem LightCycler® 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, der RNA-Extraktion und dem RNA-Gehalt.

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Flu multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für H1N1v, Influenza B und Influenza A. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 10).

Tab. 10: Kreuzreaktivitätstestung

<i>Acinetobacter baumannii</i> strain 5377	-	<i>Escherichia coli</i> (O6)	-	Human RSV strain 9320	-
Adenovirus 1, Human, strain Adenoid 71	-	<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	Human Rhinovirus Genogruppe A	-
Adenovirus 4	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MGH78578	-
Adenovirus 7, Human, strain Gomen	-	Enterovirus Typ 71, strain 2003 Isolate	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
Adenovirus 31	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. Pneumophila	-
Adenovirus 34	-	Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
Adenovirus 37	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> strain FH of Eaton Agent	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	Human Coronavirus 229E	-	<i>Neisseria meningitidis</i> strain FAM18	-
<i>Bordetella parapertussis</i> strain 12822	-	Human Coronavirus OC43	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	Human Coxsackie A2, strain Fleetwood	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Human Coxsackie B4	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Chlamydomytila pneumoniae</i>	-	Human Cytomegalovirus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain NCTC 7465	-

<i>Chlamydia psitacci</i>	-	Human Metapneumovirus	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	Human Parainfluenza virus 1 strain C35	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Corynebacterium diphtheria</i>	-	Human Parainfluenza virus 2 strain Greer	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Echovirus 11	-	Human Parainfluenza Virus serotype 3	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	Human Parainfluenza Virus 4a strain M-25	-		
<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	-	Human RSV strain Long	-		

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA® GENE Flu multiplex real-time RT-PCR wurde mit verschiedenen Stämmen von Influenza A und Influenza B Viren untersucht (s. Tab. 11).

Tab. 11: Analytische Reaktivitätstestung

Subtyp	Stamm	H1N1v	Influenza B	Influenza A
H1N1	Influenza A/Brisbane/59/2007	negativ	negativ	positiv
H1N1v	Influenza A/Brisbane/02/2018	positiv	negativ	positiv
H1N1v	Influenza A/ Michigan/45/2015	positiv	negativ	positiv
H1N1v	Influenza A/California/7/2009	positiv	negativ	positiv
H3N2	Influenza A/Perth/16/2009	negativ	negativ	positiv
H3N2	Influenza A/ Brisbane/10/2007	negativ	negativ	positiv
H3N2	Influenza A/ SouthAustralia/34/2019	negativ	negativ	positiv
H3N2	Influenza A/ Texas/50/2012	negativ	negativ	positiv

H3N2	Influenza A/ Victoria/361/2011	negativ	negativ	positiv
H3N2	Influenza A/Hong Kong/4801/2014	negativ	negativ	positiv
H3N2	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016	negativ	negativ	positiv
H3N2	Influenza A/Kansas/14/2017	negativ	negativ	positiv
H3N2	Influenza A/Switzerland/9715293/2013	negativ	negativ	positiv
H7N9	Influenza A/Anhui/1/2013	negativ	negativ	positiv
	Influenza B/Brisbane/60/2008/ Victoria-Linie	negativ	positiv	negativ
	Influenza B/ Washington/02/2019/ Victoria-Linie	negativ	positiv	negativ
	Influenza B/Colorado/06/2017 /Victoria-Linie	negativ	positiv	negativ
	Influenza B/ Wisconsin/1/2010/ Yamagata-Linie	negativ	positiv	negativ
	Influenza B/Massachusetts/2/2012/ Yamagata-Linie	negativ	positiv	negativ
	Influenza B/Phuket/3073/13/ Yamagata-Linie	negativ	positiv	negativ

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2013-12-10	Vorversion
2020-09-30	Generelle Überarbeitung: 1. Zweckbestimmung 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 7. Vorsichtsmaßnahmen 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 11. Interpretation der Ergebnisse 12. Grenzen der Methode 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung 16. Literatur

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

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

Testspezifische Symbole

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Literatur

1. World Health Organisation 2009, Fact Sheet N°211, Influenza (Saisonal)
www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html. Zugriff am 09.10.2020.
2. Robert Koch Institut
RKI_Influenzabericht_2018-19
https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/6253/RKI_Influenzabericht_2018-19.pdf. Zugriff am 30.10.2020
3. Robert Koch Institut
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza_saisonal.html. Zugriff am 09.10.2020.
4. World Health Organisation 2011, Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.