


**RIDA<sup>®</sup> GENE Flu LC2.0**  
real-time RT-PCR

Art. Nr.: PG0525  
100 Reaktionen

**Für die *in-vitro* Diagnostik.**

 -20 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Verwendungszweck

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE Flu LC2.0 ist eine real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Influenzaviren (Influenza A und Influenza B) aus humanem Nasen- und Rachenabstrich. Die RIDA®GENE Flu LC2.0 real-time RT-PCR soll die Diagnose einer durch Influenzaviren verursachten respiratorischen Infektion unterstützen.

## 2. Erläuterung

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

Weltweit erkranken 3 - 5 Millionen Menschen jährlich an Influenza und ca. 250.000 - 500.000 sterben an der Erkrankung. Die jährlichen Influenzaepidemien können schwerwiegende Auswirkungen auf das Gesundheitswesen und die Wirtschaft haben.<sup>1</sup>

In den USA verursacht die Influenza mehr als 200.000 Krankenhausaufenthalte und mehr als 36.000 Todesfälle jährlich.<sup>2</sup> In der Saison 2010/2011 wurden in Deutschland über 41.000 Influenzafälle gemeldet.<sup>3</sup>

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 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 wird durch die Subtypen H1N1 und H3N2 hervorgerufen. Neben dem mutationsbedingten Antigendrift können durch Durchmischung eines humanen und nichthumanen Influenza A Stamms neue Influenza A Subtypen (Antigenshift) 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.<sup>4</sup>

### 3. Testprinzip

RIDA<sup>®</sup>GENE Flu LC2.0 ist eine real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und Differenzierung von Influzaviren (Influenza A und Influenza B). 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 und Influenza B spezifischen Genfragmente werden anschließend mittels real-time PCR amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen (M-Gen und NP1-Gen) werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem 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 optischen Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA<sup>®</sup>GENE Flu LC2.0 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 700 µl	gelb
2	PP-Mix	1x 770 µl	grün
3	Enzyme Mix	1x 80 µl	rot
R	Internal Control RNA	2x 1800 µl	braun
N	PCR Water	1x 500 µl	weiß
P	Positive Control	1x 100 µl	blau

## 5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können 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 5 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 Geräte und Materialien

- Sterile, medienfreie Rayon oder Nylon beflockte Abstrichtupfer (z.B. Copan Diagnostic Inc., Katalognummer 155C oder 552C)
- RNA-Extraktionskit (z.B. RIDA<sup>®</sup> Xtract)  
oder  
RNA-Extraktionssystem (z.B. MagNA Pure (Roche), m2000sp (Abbott), m24sp (Abbott), NucliSENS easy<sup>®</sup>MAG<sup>™</sup> (bioMérieux))
- Real-time PCR-Gerät: LightCycler<sup>®</sup> 2.0 (Roche)
- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Reaktionsgefäße)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für die *in-vitro* Diagnostik.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- 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.
- Calciumalginat Abstrichtupfer und Abstrichtupfer mit Holz oder Aluminium Stabmaterial und/oder Baumwolle als Tupfermaterial können zur Inhibition bzw. falsch negativen Ergebnissen führen. Probenentnahme nur mit den empfohlenen Abstrichtupfern durchführen (s. Abschnitt 6. Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien).

## 8. Testdurchführung

### 8.1 Probenentnahme

Abstrichtupfer mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung anfeuchten oder trocken verwenden. Nasen-/ Rachenabstrichprobe mit dem empfohlenen Abstrichtupfer (siehe Abschnitt 6. Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien) nach Angabe des Herstellers durchführen.

### 8.2 RNA-Präparation

Für die RNA-Präparation aus Nasen- und Rachenabstrichen wird folgende Isolationsmethode empfohlen: 200 µl Wasser (RNase-frei) in ein Präparationsröhrchen vorlegen. Den Abstrichtupfer in das Wasser tauchen und den Stab abbrechen oder abschneiden. Das Präparationsröhrchen dicht verschließen, kurz vortexen und die RNA Präparation laut Herstellerangabe des RNA-Isolierungskits oder RNA-Extraktionssystems durchführen.

Der RIDA®GENE Flu LC2.0 Test enthält eine Internal Control RNA (ICR), die entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

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

Wird die Internal Control RNA (ICR) als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der ICR während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICR soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der ICR zum RT-PCR Mix der Negativ- und Positivkontrolle zu pipettieren.

### 8.3 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Wir empfehlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab.2, Tab.3). Vor der Benutzung den Reaction Mix, den PP-Mix, den Enzyme Mix, die Positive Control, das PCR Water und die ICR auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab.2: 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	12,5 µl	137,5 µl
2	PP-Mix (Primer-Probe-Mix)	6,9 µl	75,9 µl
3	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>20,1 µl</b>	<b>221,1 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

Tab.3: 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	12,5 µl	137,5 µl
2	PP-Mix (Primer-Probe-Mix)	6,9 µl	75,9 µl
3	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>21,1 µl</b>	<b>232,1 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

#### 8.4 Herstellung des RT-PCR Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

**Negativkontrolle:** Je 5 µl PCR Water zum vorgelegten Master-Mix als Negativkontrolle pipettieren.

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

**Proben:** Je 5 µl RNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix der Probenreaktionen pipettieren.

**Positivkontrolle:** Je 5 µl Positive Control zum vorgelegten Master-Mix in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettieren.

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

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz abzentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die RT-PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab.4).

## 8.5 Geräteeinstellungen

Tab.4: Real-time PCR Profil für den LightCycler® 2.0

Reverse Transkription	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
PCR Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 55 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

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

## 8.6 Detektionskanaleinstellung

Tab.5: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Dark-Quencher	Bemerkung
Roche LightCycler® 2.0	Influenza A	530	+	RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) wird benötigt
	ICR	560	+	
	Influenza B	705	+	



## 9. Interpretation der Ergebnisse

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

Die Positivkontrolle liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien /  $\mu\text{l}$  vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Abb.1: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (Influenza A) auf dem LightCycler<sup>®</sup> LC2.0

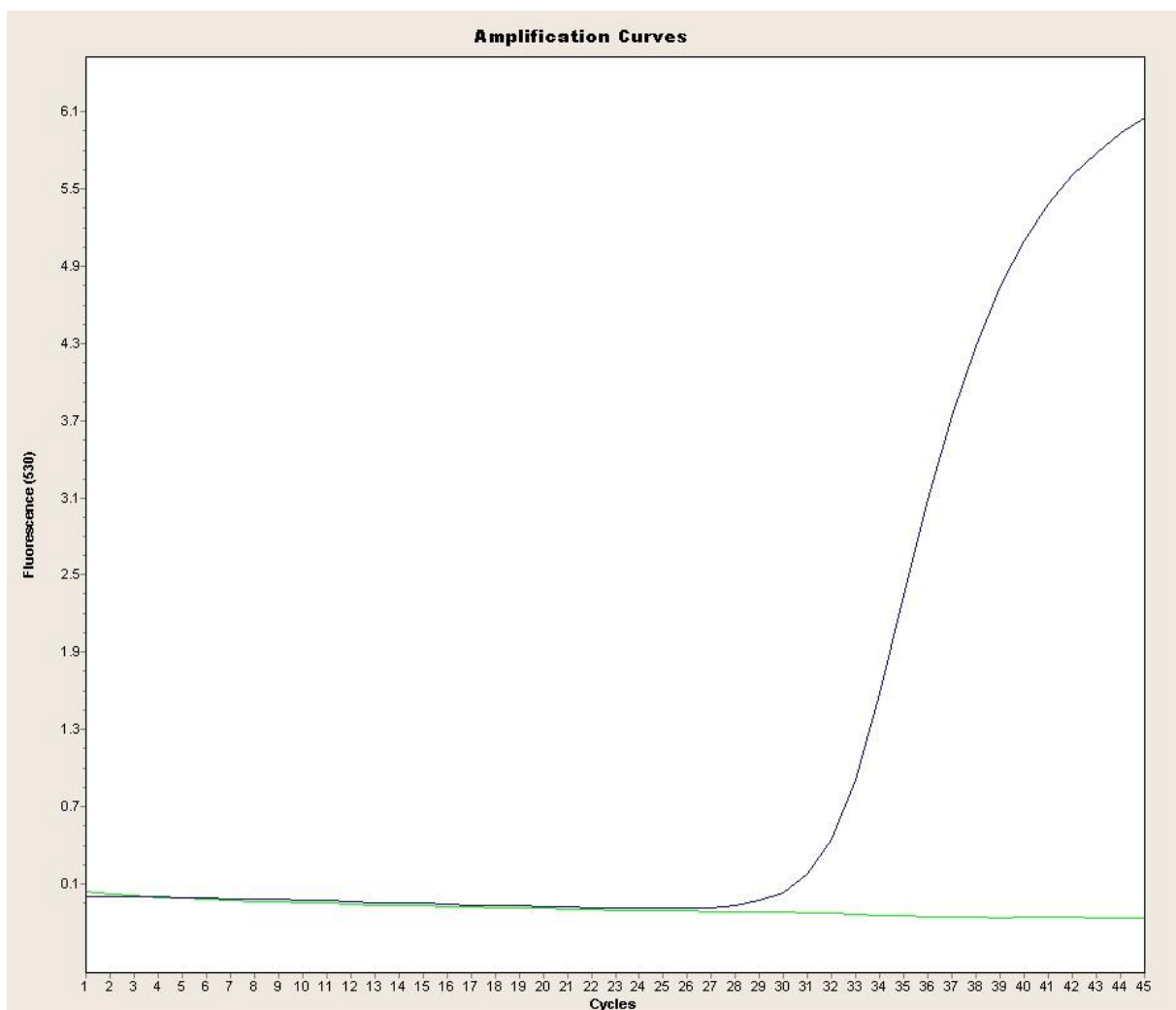
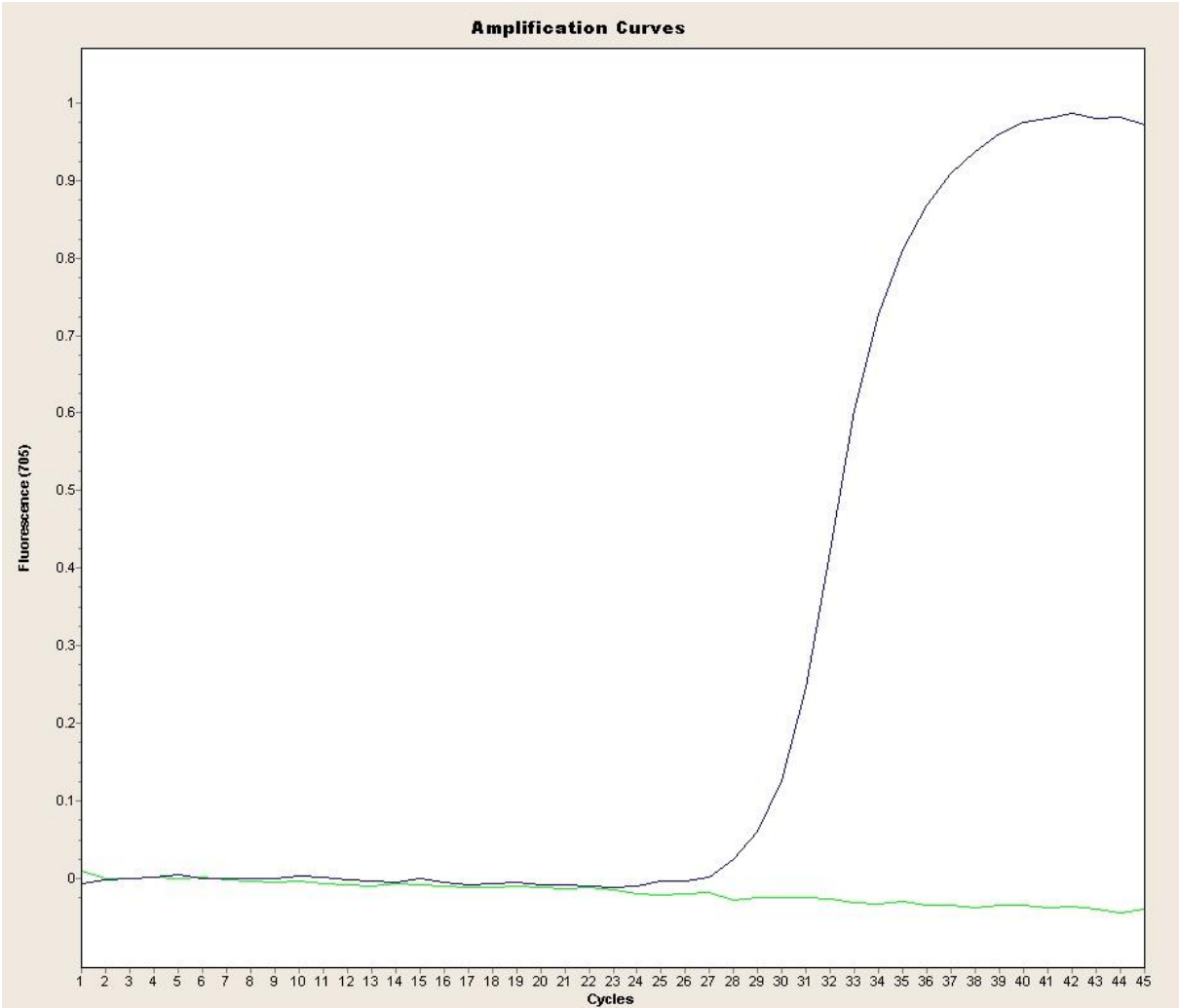


Abb.2: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (Influenza B) auf dem LightCycler® LC2.0



Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 6.

Tab.6: Interpretation der Ergebnisse

Zielgene			
M-Gen (Influenza A)	NP1-Gen (Influenza B)	ICR	Ergebnis
<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv/negativ</b>	<b>Influenza A</b>
negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv/negativ</b>	<b>Influenza B</b>
negativ	negativ	<b>positiv</b>	<b>Negativ</b> (Zielgene nicht nachweisbar)
negativ	negativ	negativ	<b>Nicht auswertbar</b>

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die zugehörige Internal Control RNA (ICR) positiv ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion bzw. ein Fehler im Extraktionsverfahren kann durch die Detektion der Internal Control RNA (ICR) ausgeschlossen werden.

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben eine Amplifikation im Nachweissystem und in der dazugehörigen Internal Control RNA (ICR) zeigt.

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben eine Amplifikation im Nachweissystem, jedoch keine für die Internal Control RNA (ICR) zeigt. Der Nachweis der Internal Control RNA (ICR) ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control RNA (ICR) führen können.

Eine Probe ist nicht auswertbar, wenn die Proben-RNA und die Internal Control RNA (ICR) im Nachweissystem keine Amplifikation 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.

## 10. Leistungsmerkmale

### 10.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA<sup>®</sup>GENE Flu LC2.0 real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 50$  RNA-Kopien / Reaktion für Influenza A und Influenza B (s. Abb.3, Abb.4).

Abb.3: Verdünnungsreihe Influenza A ( $10^5$  -  $10^1$  RNA Kopien /  $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 2.0

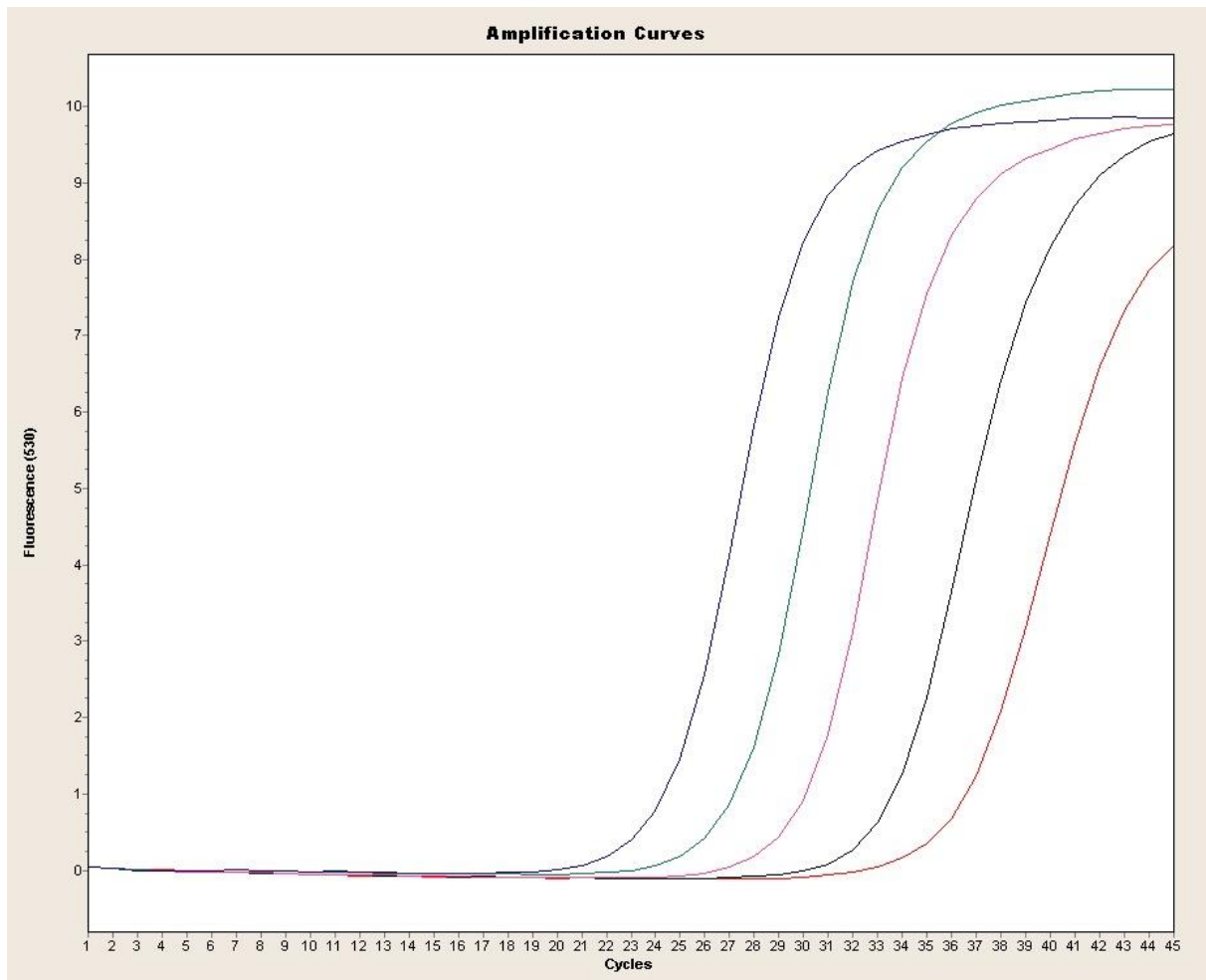
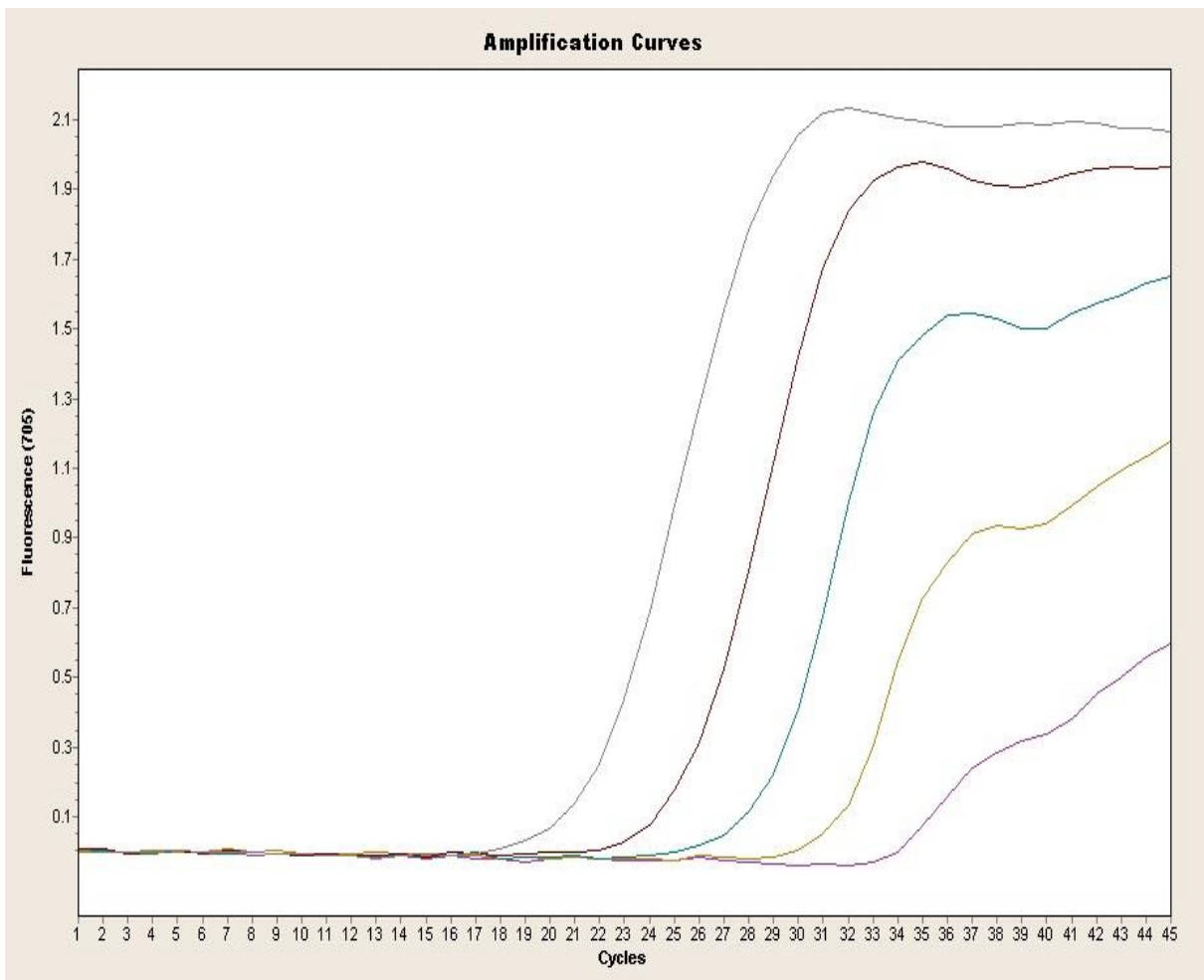


Abb.4: Verdünnungsreihe Influenza B ( $10^5$  -  $10^1$  RNA Kopien /  $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 2.0



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

## 10.2 Analytische Spezifität

Die RIDA<sup>®</sup>GENE Flu LC2.0 real-time RT-PCR ist spezifisch für Influenzaviren (Influenza A und Influenza B). Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab.7):

Tab.7: Kreuzreaktivitätstestung

<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Adenovirus (Typ 1, 4, 34)	-	Enteropathogene <i>E.coli</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	Enterotoxische <i>E. coli</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Shigatoxin bildende <i>E.coli</i>	-	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		

### 10.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA<sup>®</sup>GENE Flu LC2.0 real-time RT-PCR wurde mit verschiedenen Stämmen von Influenza A und Influenza B Viren untersucht (s. Tab.8). Alle Influenza A und Influenza B Stämme des Probenpanels wurden mit der RIDA<sup>®</sup>GENE Flu LC2.0 real-time RT-PCR nachgewiesen.

Tab.8: Analytische Reaktivitätstestung

<b>Subtyp</b>	<b>Stamm</b>	<b>Influenza A</b>	<b>Influenza B</b>
H1N1	Influenza A/Brisbane/59/2007	<b>positiv</b>	negativ
H1N1v	Influenza A/Bayern/63/2009	<b>positiv</b>	negativ
H1N1v	Influenza A/California/7/2009	<b>positiv</b>	negativ
H5N1	Influenza A/Chicken/Germany/R3294/2007	<b>positiv</b>	negativ
H3N2	Influenza A/Perth/16/2009	<b>positiv</b>	negativ
	Influenza B/ Brisbane/60/2008	negativ	<b>positiv</b>

## **11. Grenzen des Verfahrens**

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Nasen- und Rachenabstriche validiert.
3. Dieser Test kann nicht zum Nachweis von Influenza C Viren verwendet werden.
4. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Viruslast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
5. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
6. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregion können den Nachweis neuer Influenza Subtypen beeinträchtigen und mit RIDA®GENE Flu LC2.0 zu falsch negativen Ergebnissen führen.
7. 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.

## **12. Literatur**

1. World Health Organisation 2009, Fact Sheet N°211, Influenza (Saisonal) [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html). Aufgerufen am 30.05.2012.
2. Center for Disease Control and Prevention 2008. Prevention and Control of Influenza: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) 2008.MMWR 57(RR07):1-60.
3. Robert Koch Institut. Arbeitsgemeinschaft Influenza. Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2010/2011.
4. World Health Organisation 2011, Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.