

## RIDA® GENE Flu & RSV

**REF** PG0545



## 1. Zweckbestimmung

Für die in-vitro Diagnostik. Der RIDA®GENE Flu & RSV 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 Respiratorischen Synzytial-Viren (RSV A und B) RNA aus humanen Nasen-/ Rachenabstrichen und BAL von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer akuten respiratorischen Infektion.

Der RIDA®GENE Flu & RSV Test ist zur Unterstützung der Differentialdiagnose von Infektionen durch Influenzaviren (Influenza A, Influenza B) und Respiratorische Synzytial-Viren (RSV A und B) bei Patienten mit Symptomen einer respiratorischen Infektion in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen.

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit Influenzaviren (Influenza A, Influenza B) und Respiratorischen Synzytial-Viren (RSV A und B) 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.<sup>1</sup>

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.<sup>2</sup>

Die Arbeitsgemeinschaft Influenza (AGI) des Robert Koch Institut schätzt pro Jahr zwischen einer und sieben Millionen Influenza-bedingte Arztbesuche. Bei einer schweren Grippewelle wie in der Saison 2012/2013 wurden rund 30.000 Influenza-bedingte Krankenhauseinweisungen und 20.000 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.<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 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.<sup>4</sup>

Respiratorische Synzytial-Viren (RSV) gehören zur Familie der *Pneumoviridae* und sind umhüllte, einzelsträngige RNA (ss-RNA) Viren. Es zirkulieren zwei Gruppen von RSV, A und B, wobei RSV A in den meisten Jahren dominiert.<sup>5</sup>

RSV ist ein weltweit verbreiteter Erreger und kann zu Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege in jedem Lebensalter führen. Bei Säuglingen, insbesondere Frühgeborenen und Kleinkindern ist RSV einer der bedeutendsten Erreger von Atemwegsinfektionen.<sup>5</sup> RSV wird durch Schmier- oder Tröpfcheninfektion übertragen und äußert sich in Symptomen wie Rhinitis, Erkältung, Husten, akuter Bronchitis oder auch einer Mittelohrentzündung. Ein akuter Verlauf kann bei einer bakteriellen Superinfektion vorkommen.<sup>6</sup> Bei Kleinkindern und Säuglingen tritt häufig ein schwerer Verlauf auf, der eine stationäre Behandlung benötigt. Hierbei treten Symptome wie Fieber, Schnupfen und Tachypnoe auf. Schätzungen zufolge kommen RSV-Atemwegserkrankungen weltweit mit einer Inzidenz von 48,5 Fällen und 5,6 schweren Fällen pro 1.000 Kindern im ersten Lebensjahr vor. 50 – 70% der Säuglinge und Kleinkinder haben eine RSV Infektion in ihrem ersten Lebensjahr, während nach dem zweiten Lebensjahr fast 100% eine RSV Infektion hinter sich haben.<sup>5</sup>

### 3. Testprinzip

Der RIDA®GENE Flu & RSV Test ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Influenzaviren (Influenza A, Influenza B) und Respiratorischem-Synzytial-Virus (RSV A und B) RNA aus humanem Nasen- und Rachenabstrich und BAL (siehe Kapitel 9.4). 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 spezifischen Genfragmente für Influenza A, Influenza B und RSV (Influenza A/B: M-Gen und NP1-Gen; RSV: F-Gen) werden anschließend mittels real-time 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 & RSVTest 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 Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE Flu & RSV 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 & RSV multiplex real-time RT-PCR Test kompatibel für die Verwendung mit folgender Extraktionsplattform und real-time PCR-Geräten:

**Tab. 2:** 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](mailto: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](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

### 8.1 RNA-Präparation aus Nasen- und Rachenabstrichen

Für die RNA-Präparation aus Nasen- und Rachenabstrichen wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell<sup>®</sup> 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<sup>®</sup>GENE Flu & RSV 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 je Reaktion dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control RNA je Probe 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 pro Reaktion der Internal Control RNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

## 8.2 RNA-Präparation aus BAL

Für die RNA-Präparation aus BAL 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 & RSV 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 je Reaktion dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4). Wird die Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control RNA je Probe 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 pro Reaktion der Internal Control RNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

## 9. Testdurchführung

### 9.1 Herstellung des Master-Mix

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

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, den **Enzyme Mix**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control RNA** auftauen, 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
	<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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
	<b>Gesamt</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

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:** 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 1 µl der **Internal Control RNA** zum RT-PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

**Proben:** 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Positivkontrolle:** 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 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 PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

## 9.3 Geräteeinstellungen

### 9.3.1 Universal real-time RT-PCR Profil

**Tab. 5:** Universal real-time RT-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 RT-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	Bemerkung
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	RSV A/B	Green	-
	ICR	Yellow	
	Influenza B	Orange	
	Influenza A	Red	
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	RSV A/B	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt</b>
	ICR	533/580	
	Influenza B	533/610	
	Influenza A	618/660	
<b>Agilent Technologies Mx3005P</b>	RSV A/B	FAM	<b>Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none</b>
	ICR	HEX	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
<b>ABI 7500 Fast Dx</b>	RSV A/B	FAM	<b>Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none</b>
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	RSV A/B	FAM	-
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
<b>Qiagen Rotor- Gene Q</b>	RSV A/B	Green	<b>Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein</b>
	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 **Positive Control** liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  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 * <sup>1</sup>	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	Nicht nachweisbar

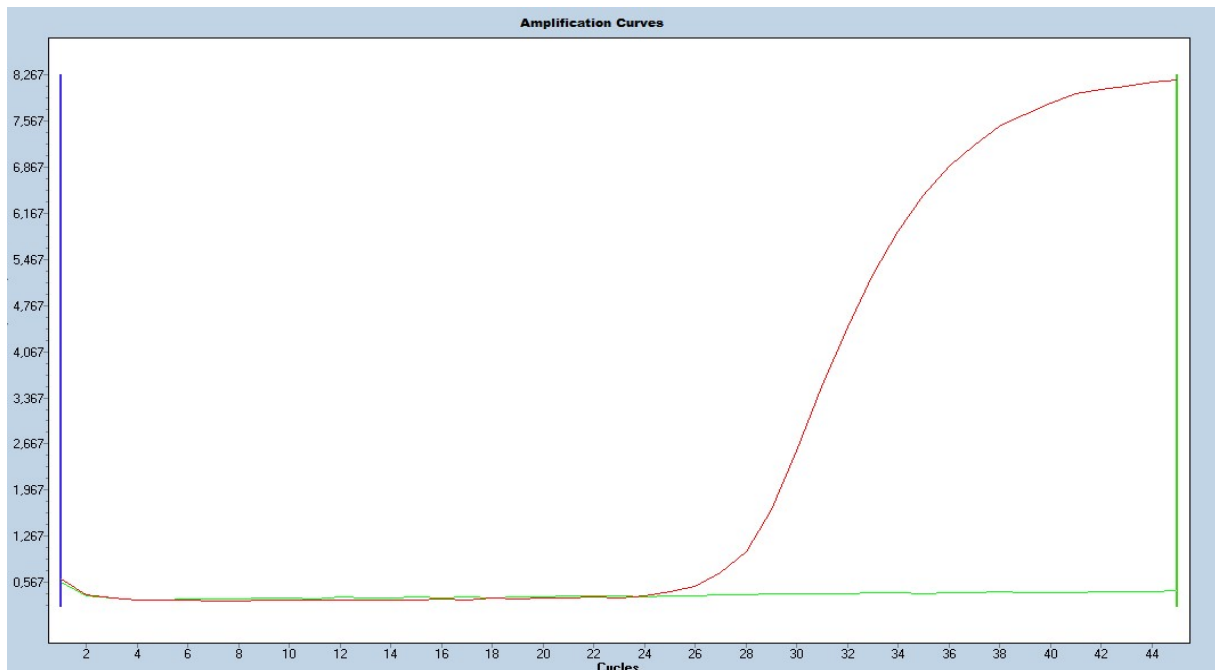
*\*<sup>1</sup> Ein Ct-Wert für die ICR ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.*

Wenn die Positivkontrolle nicht in dem angegebenen Ct-Bereich liegt, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

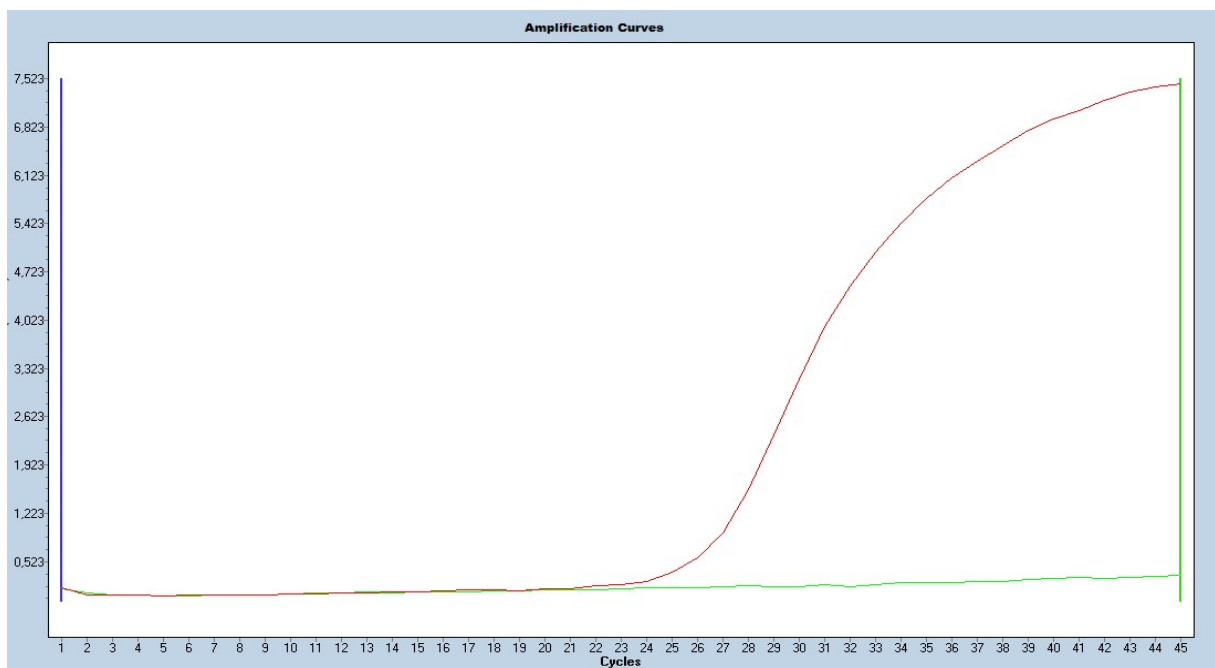
Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

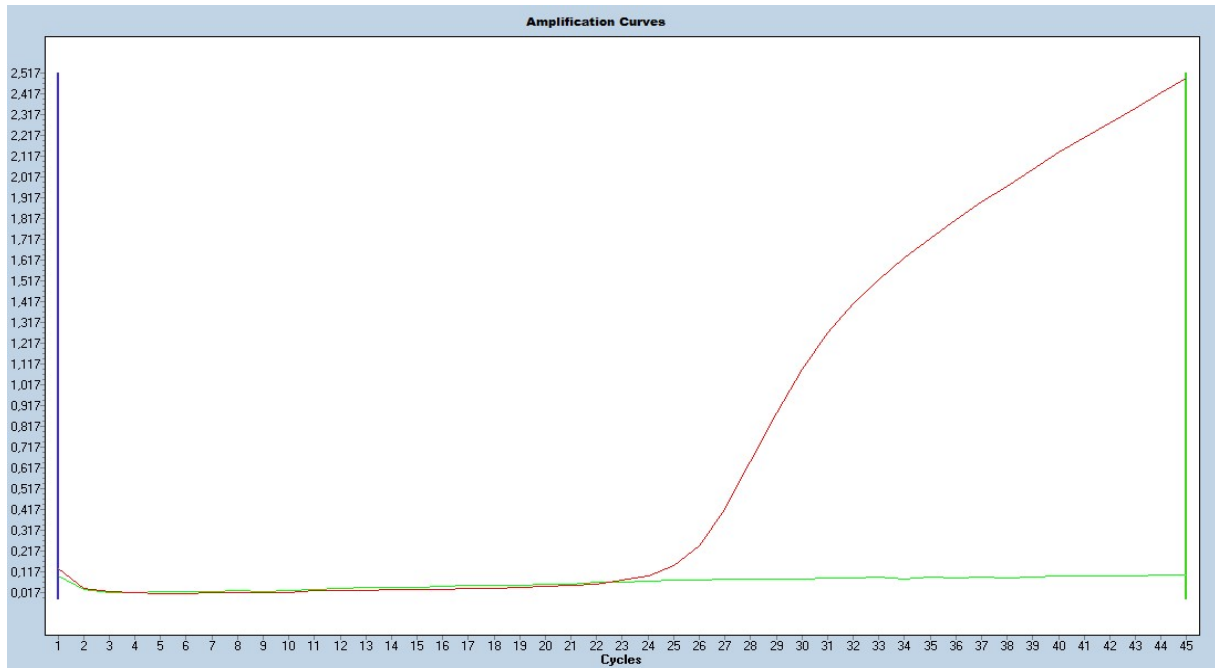
- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung



**Abb. 1:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (RSV) 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			ICR	Ergebnis
F-Gen (RSV A/B)	NP1-Gen (Influenza B)	M-Gen (Influenza A)		
positiv	negativ	negativ	positiv/ negativ	RSV nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/ negativ	Influenza B nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/ negativ	Influenza A nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/ negativ	RSV und Influenza B nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv/ negativ	RSV und Influenza A nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv/ negativ	Influenza B und Influenza A nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv	Influenza A, Influenza B und RSV nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

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 es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

## 12. Grenzen der Methode

1. Dieser Test ist nur für Nasen- und Rachenabstriche und BAL geeignet.
2. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast 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 & RSV 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. Dieser Test kann nicht zum Nachweis von Influenza-C Viren verwendet werden.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit replikationsfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (Influenza A/B: M-Gen und NP1-Gen; RSV: F-Gen) vorhanden sind.
8. Ab einer getesteten Konzentration von 3,0 % zeigt Paracodin einen inhibitorischen Effekt.
9. Ab einer getesteten Konzentration von 17,5 mg/ml zeigt Ciprofloxacin einen inhibitorischen Effekt.

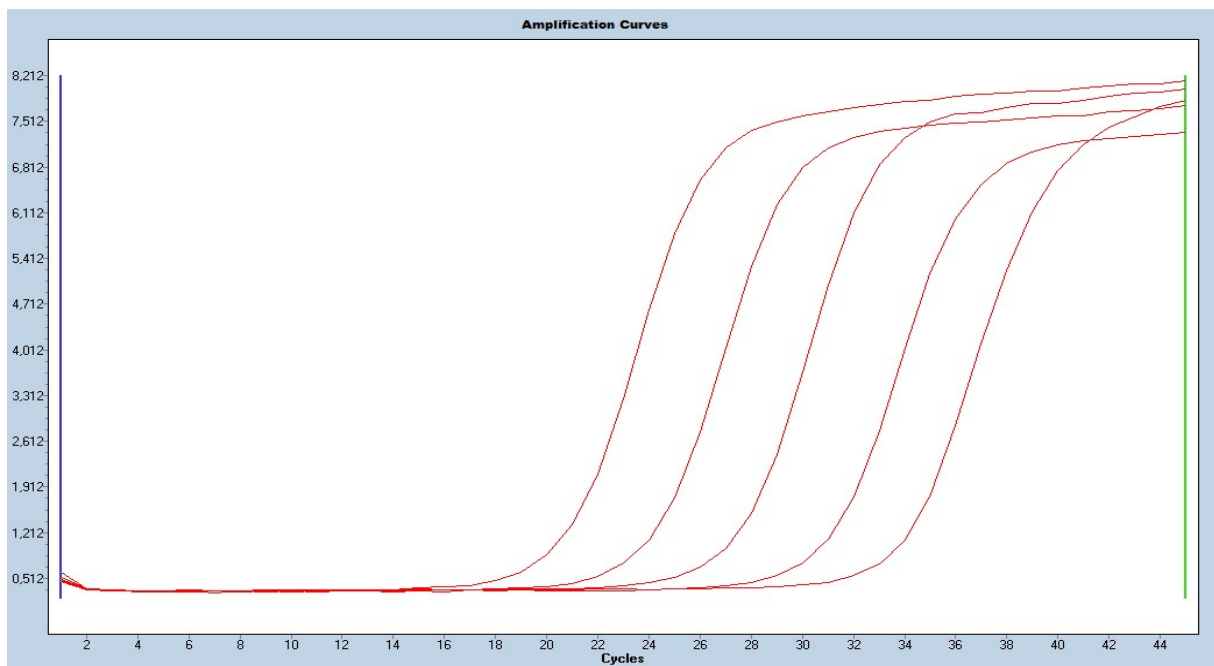


## 13. Leistungsmerkmale

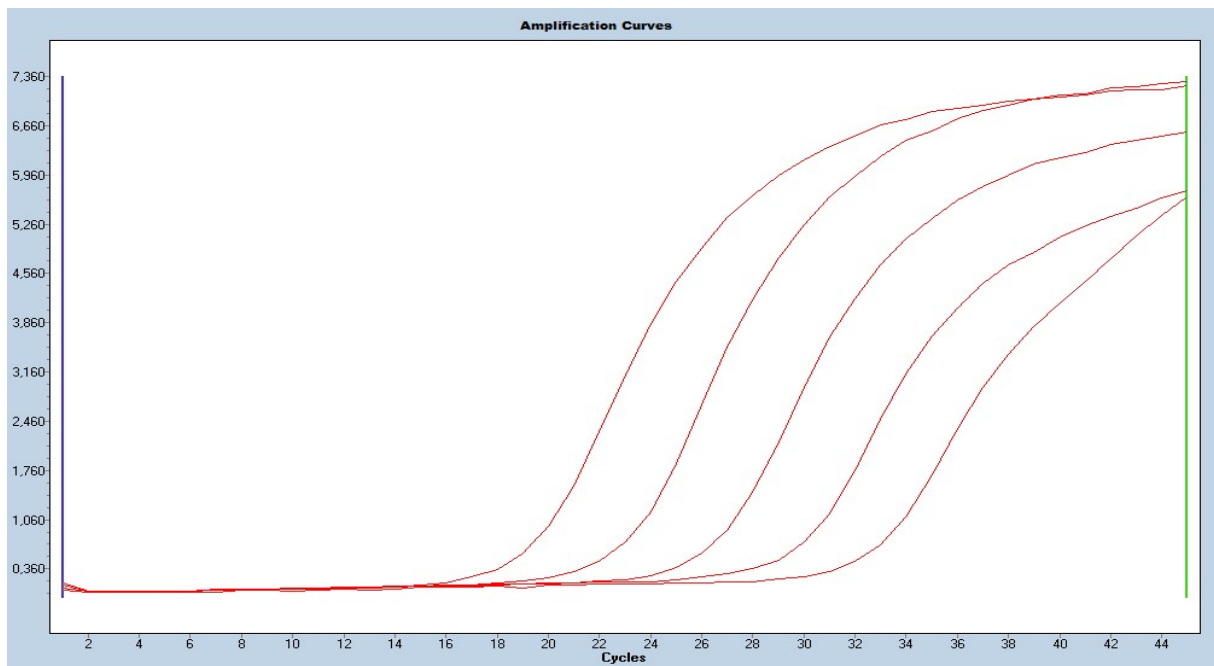
### 13.1 Analytische Sensitivität

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

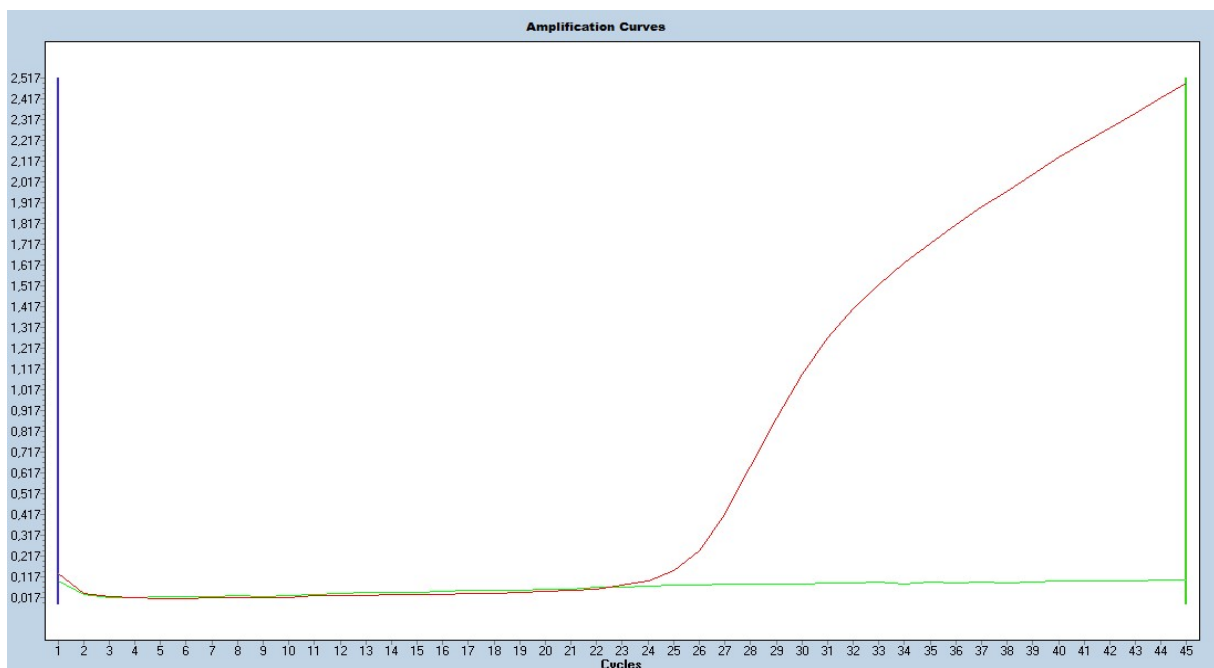
Die folgenden Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen Verdünnungsreihen von RSV, Influenza B und Influenza A (jeweils  $5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$  RNA Kopien/Reaktion) auf dem LightCycler® 480II.



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



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



**Abb. 6:** Verdünnungsreihe Influenza A ( $5 \times 10^5$  –  $5 \times 10^1$  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 & RSV multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für RSV A/B, Influenza A, Influenza B. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 10).

**Tab. 10:** Kreuzreaktivitätstestung

<i>Acinetobacter baumannii</i> strain 5377	-	<i>Corynebacterium diphtheria</i>	-	Human Coxsackie B4	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (NATrol Recombinant External Run Control)	-
Adenovirus 1, Human, strain Adenoid 71	-	Echovirus 11	-	Human Cytomegalovirus	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 4	-	Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	Human Metapneumovirus	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 7, Human, Strain Gomen	-	<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	-	Human Parainfluenza virus 1 strain C35	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
Adenovirus 31	-	<i>Escherichia coli</i> (O6)	-	Human Parainfluenza virus 2 strain Greer	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain NCTC 7465	-
Adenovirus 34	-	<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	Human Parainfluenza Virus serotype 3	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Adenovirus 37	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Human Parainfluenza Virus 4a strain M-25	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Aspergillus terreus</i>		Enterovirus Typ 71, strain 2003 Isolate		Human Rhinovirus Genogruppe A		<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Bordetella parapertussis</i> Strain 12822	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MGH78578	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-

<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-		
<i>Candida albicans</i>	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. Pneumophila	-		
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Human Coronavirus OC43	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-		
<i>Chlamydia psitacci</i>	-	Human Coronavirus 229E	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> strain FH of Eaton Agent	-		
<i>Clostridium perfringens</i>	-	Human Coxsackie A2, strain Fleetwood	-	<i>Neisseria meningitidis</i> strain FAM18	-		

### 13.4 Analytische Reaktivität

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

**Tab. 11:** Analytische Reaktivitätstestung

Subtyp	Stamm	RSV	Influenza B	Influenza A
H1N1v	Influenza A/ Brisbane/02/2018	negativ	negativ	<b>positiv</b>
H1N1v	Influenza A/ Michigan/45/2015	negativ	negativ	<b>positiv</b>
H1N1v	Influenza A/ California/7/2009	negativ	negativ	<b>positiv</b>
H1N1	Influenza A/ Brisbane/59/2007	negativ	negativ	<b>positiv</b>
H3N2	Influenza A/Kansas/14/2017	negativ	negativ	<b>positiv</b>
H3N2	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016	negativ	negativ	<b>positiv</b>
H3N2	A/Hong Kong/4801/2014	negativ	negativ	<b>positiv</b>










H3N2	Influenza A/ Switzerland/9715293/2013	negativ	negativ	<b>positiv</b>
H3N2	Influenza A/ Texas/50/2012	negativ	negativ	<b>positiv</b>
H3N2	Influenza A/Victoria/361/2011	negativ	negativ	<b>positiv</b>
H3N2	Influenza A/Perth/16/2009	negativ	negativ	<b>positiv</b>
H3N2	Influenza A/ Brisbane/10/2007	negativ	negativ	<b>positiv</b>
H3N2	Influenza A/South Australia/34/ 2019	negativ	negativ	<b>positiv</b>
H7N9	Influenza A/Anhui/1/2013	negativ	negativ	<b>positiv</b>
	Influenza B/ Colorado/06/2017/ Victoria-Linie	negativ	<b>positiv</b>	negativ
	Influenza B/ Brisbane/60/2008/ Victoria-Linie	negativ	<b>positiv</b>	negativ
	Influenza B/ Washington/02/2019/ Victoria-Linie	negativ	<b>positiv</b>	negativ
	Influenza B/ Massachusetts/2/2012/ Yamagata -Linie	negativ	<b>positiv</b>	negativ
	Influenza B/ Phuket/3073/2013/ Yamagata -Linie	negativ	<b>positiv</b>	negativ
	Influenza B/ Wisconsin/1/2010/ Yamagata -Linie	negativ	<b>positiv</b>	negativ
	RSV A (Isolate:2006 Isolate)	<b>positiv</b>	negativ	negativ
	RSV A strain long	<b>positiv</b>	negativ	negativ
	RSV B (strain: CH93(18)-18)	<b>positiv</b>	negativ	negativ
	RSV B strain 9320	<b>positiv</b>	negativ	negativ

## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2014-07-01	Vorversion
2020-10-13	<b>Generelle Überarbeitung:</b> 1. Zweckbestimmung 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 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](http://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](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](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.
5. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_RSV.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_RSV.html)  
Zugriff am 15.10.2020