



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

RIDA®GENE Flu & RSV
real-time RT-PCR

Art. Nr.: PG0545
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 & RSV 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) aus humanem Nasen- und Rachenabstrich und BAL.

Die RIDA®GENE Flu & RSV multiplex real-time RT-PCR soll die Diagnose einer durch Influenzaviren und RSV verursachten respiratorischen Infektion unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

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.¹ In den USA verursacht die Influenza mehr als 200.000 Krankenhausaufenthalte und mehr als 36.000 Todesfälle jährlich.² In der Saison 2010/2011 wurden in Deutschland über 41.000 Influenzafälle gemeldet.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 aufgrund ihrer Diversität die größte Rolle: Sie sind verantwortlich für drei Pandemien im 20. Jahrhundert sowie für die Mehrzahl der Grippeepidemien. 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. 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

Respiratorische Synzytial-Viren (RSV) gehören zur Familie der *Paramyxoviridae* 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.⁵

RSV ist ein weltweit verbreiteter Erreger und kann zu Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege in jedem Lebensalter führen. 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 und weltweit sterben jährlich schätzungsweise 600.000 Menschen entweder direkt oder indirekt durch RSV.⁶ Bei Kleinkindern und Säuglingen tritt häufig ein schwerer Verlauf auf, der eine stationäre Behandlung benötigt. Hierbei treten Symptome wie Fieber, Schnupfen und Tachypnoe auf. 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.⁵

3. Testprinzip

RIDA®GENE Flu & RSV 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). 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, Influenza B und RSV spezifischen Genfragmente werden anschließend mittels real-time RT-PCR amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen (Influenza A/B: M-Gen und NP1-Gen; RSV: F-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®GENE Flu & RSV 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 Reagenzien – erforderliches Zubehör

- Sterile, medienfreie Rayon oder Nylon beflockte Abstrichtupfer (z.B. Copan Diagnostic Inc., Katalognummer 155C oder 552C), MSwab (Copan)
- Der RIDA®GENE Flu & RSV real-time RT-PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR Geräten:
- Extraktionsplattformen:
 - RIDA® Xtract (R-Biopharm)
 - Maxwell®16 (Promega)
 - MagNA Pure 96 (Roche)
- Real-time PCR-Gerät:

Roche:	LightCycler® 480II
Agilent Technologies:	Mx3005P
Applied Biosystems:	ABI 7500
Abbott:	m2000rt
Bio-Rad:	CFX96™

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.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) 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

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 Test 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 Material Safety Data Sheets (MSDS) unter www.r-biopharm.com

8. Sammlung und Lagerung der Proben

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.

Bemerkung: *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.*

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.

Für die RNA-Präparation aus bronchoalveolarer Lavage wird ein kommerziell erhältliches RNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®]16 (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA[®]GENE Flu & RSV 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 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 ICR zum RT-PCR Mix der Negativ- und 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 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, die Positive Control, das PCR Water und die Internal Control RNA 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
	Gesamt	20,1 µl	221,1 µl

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
	Gesamt	21,1 µl	232,1 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

9.2 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).

9.3 Geräteeinstellungen

Tab. 4: Real-time RT-PCR Profil

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.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 5: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	RSV	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) wird benötigt
	ICR	533/580	
	Influenza B	533/610	
	Influenza A	618/660	
ABI 7500	RSV	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
Abbott m2000rt	RSV	FAM	-
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	RSV	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	HEX	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	RSV	FAM	-
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	

10. Qualitätskontrolle

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. Tab. 6, 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. 6: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
PTC	Positiv	NA * ¹	Siehe QAC
NTC	Negativ	Ct > 20	0

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

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

Wenn die Negativkontrolle (NTC) nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Negativkontrolle 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 Positiv- und Negativkontrolle (RSV) auf dem LightCycler® 480II

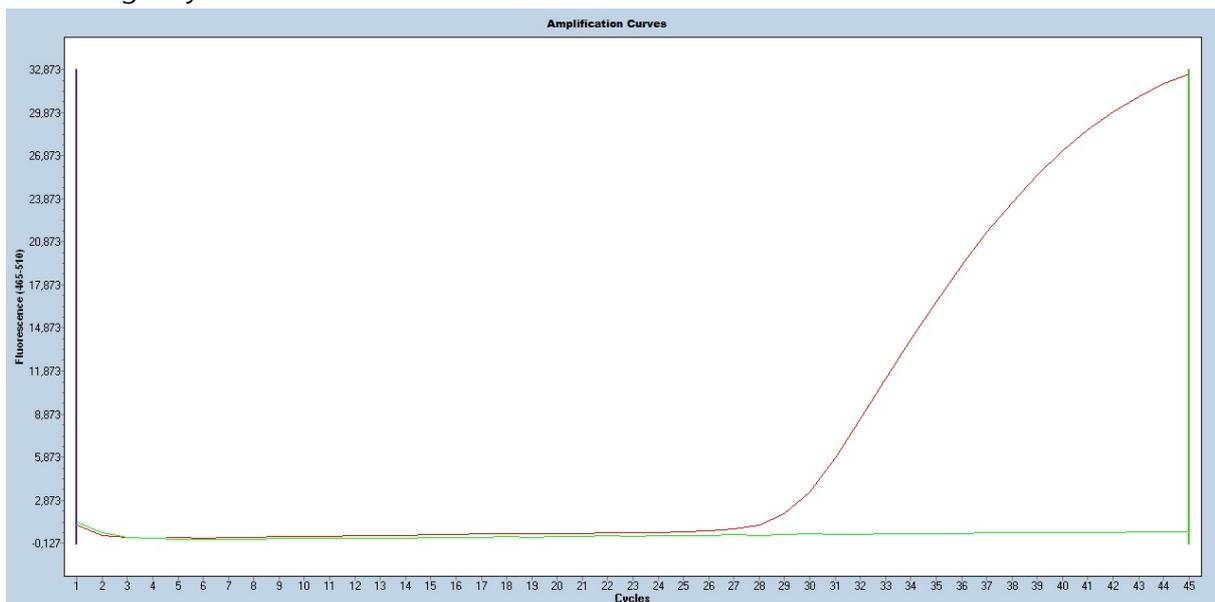


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (Influenza B) auf dem LightCycler® 480II

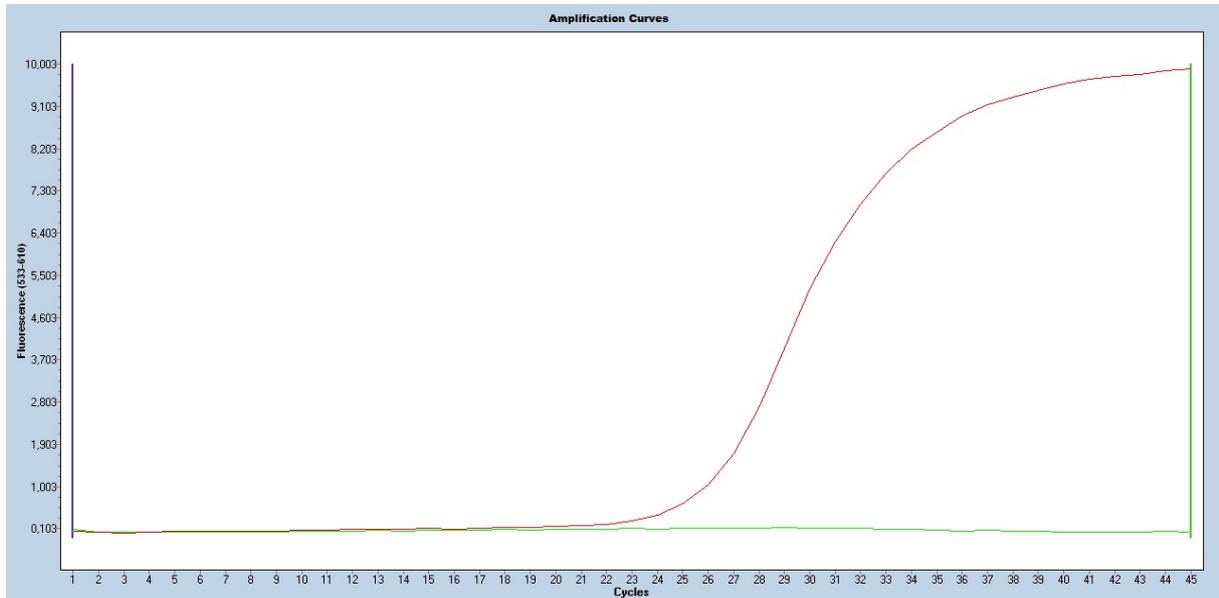
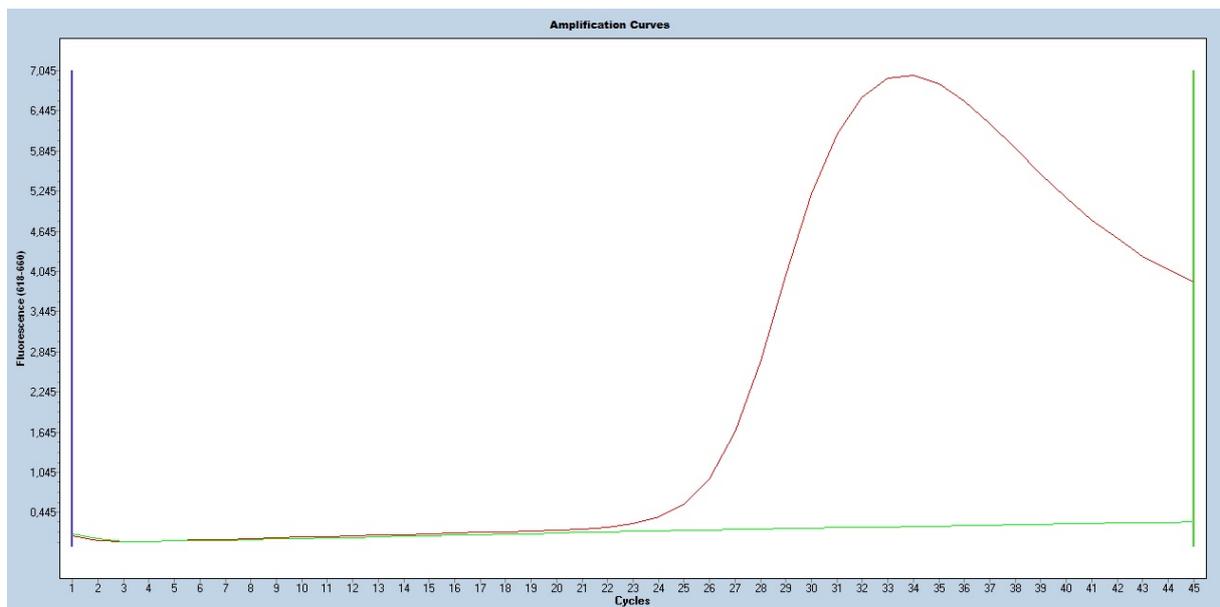


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (Influenza A) auf dem LightCycler® 480II



11. Auswertung und Interpretation

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 7.

Tab. 7: Interpretation der Ergebnisse

Zielgene				
F-Gen (spez. für RSV)	NP1-Gen (spez. für Influenza B)	M-Gen (spez. für Influenza A)	Internal Control RNA (ICR)	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	RSV
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	Influenza B
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	Influenza A
negativ	negativ	negativ	positiv	Negativ (Zielgene sind nicht nachweisbar)
negativ	negativ	negativ	negativ	Nicht auswertbar

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.

12. Grenzen der Methode

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 und BAL 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 & RSV 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.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Klinisches Leistungsmerkmal

In einer retrospektiven klinischen Validierungsstudie wurden bekannt positive und bekannt negative Proben (Rachen- und Nasenabstriche) mit dem RIDA®GENE Flu & RSV Test und einer in-house real-time PCR in einem Institut in Deutschland untersucht.

Tab. 8: Korrelation der RSV Ergebnisse mit der RIDA®GENE Flu & RSV real-time RT-PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR		Insgesamt	
		Positiv	Negativ		
RIDA®GENE Flu & RSV	Positiv	18	0	18	Positive Übereinstimmung: 100%
	Negativ	0	100	100	Negative Übereinstimmung: 100%
Insgesamt		18	100	118	

Tab. 9: Korrelation der Influenza B Ergebnisse mit der RIDA®GENE Flu & RSV real-time RT-PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR		Insgesamt	
		Positiv	Negativ		
RIDA®GENE Flu & RSV	Positiv	21	0	21	Positive Übereinstimmung: 100%
	Negativ	2	101	103	Negative Übereinstimmung: 100%
Insgesamt		23	101	124	

Tab. 10: Korrelation der Influenza A Ergebnisse mit der RIDA®GENE Flu & RSV real-time RT-PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR		Insgesamt	
		Positiv	Negativ		
RIDA®GENE Flu & RSV	Positiv	23	0	23	Positive Übereinstimmung: 100%
	Negativ	1	101	102	Negative Übereinstimmung: 100%
Insgesamt		24	101	125	

13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE Flu & RSV multiplex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 50 RNA-Kopien/Reaktion für RSV, Influenza B und Influenza A (s. Abb. 4, Abb. 5, Abb. 6).

Abb. 4: Verdünnungsreihe RSV (10^5 - 10^1 RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

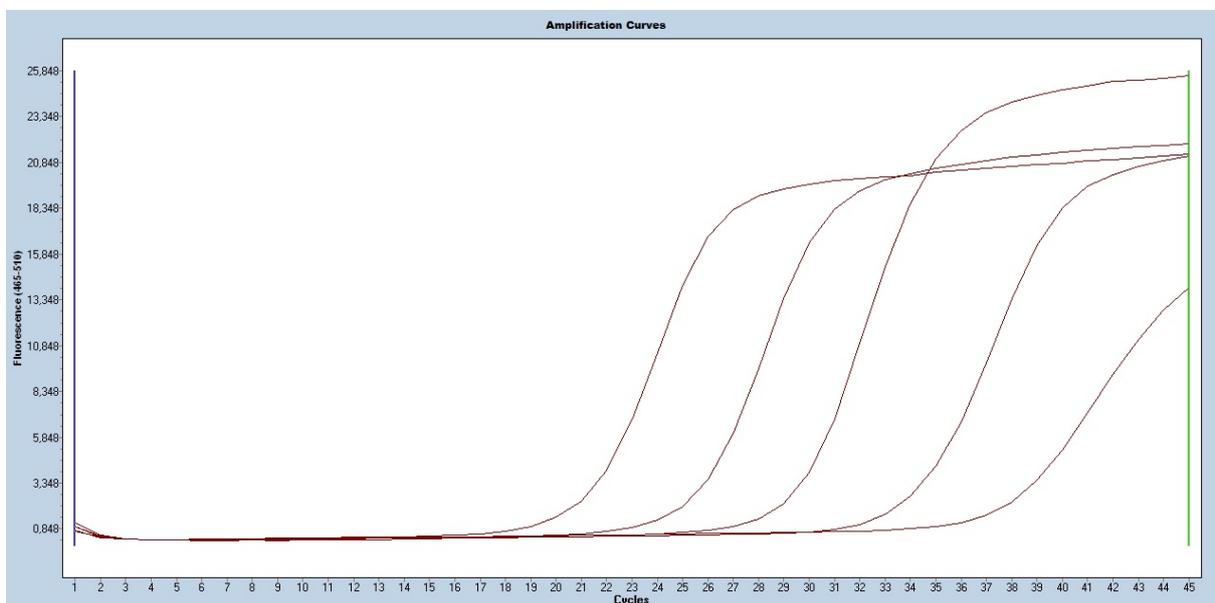


Abb. 5: Verdünnungsreihe Influenza B ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) dem LightCycler[®] 480II

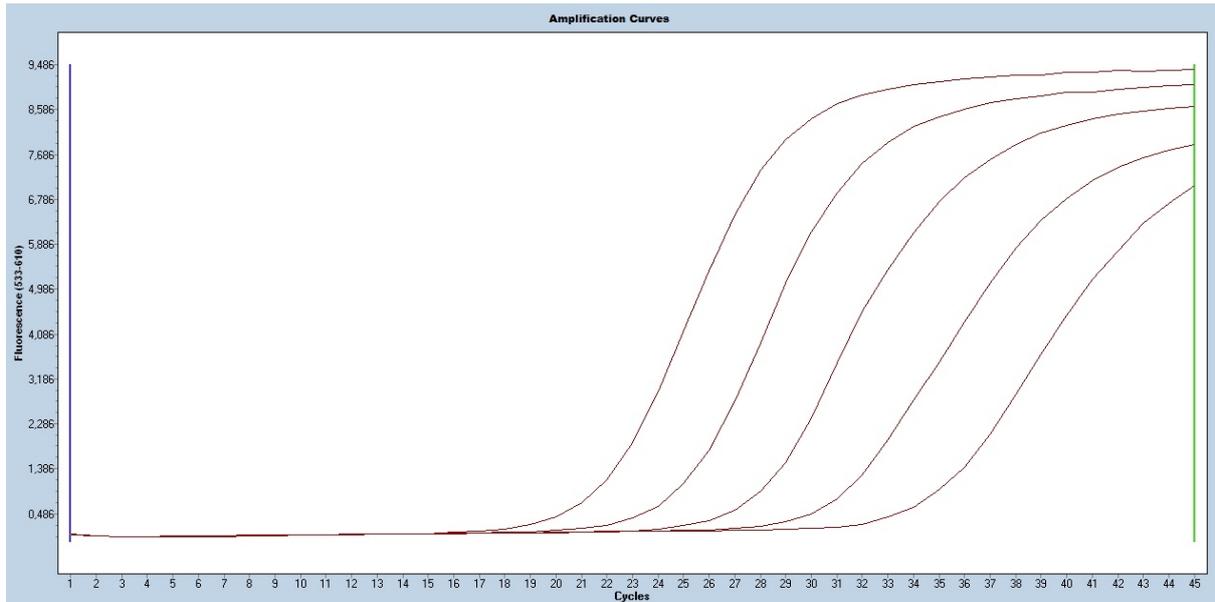
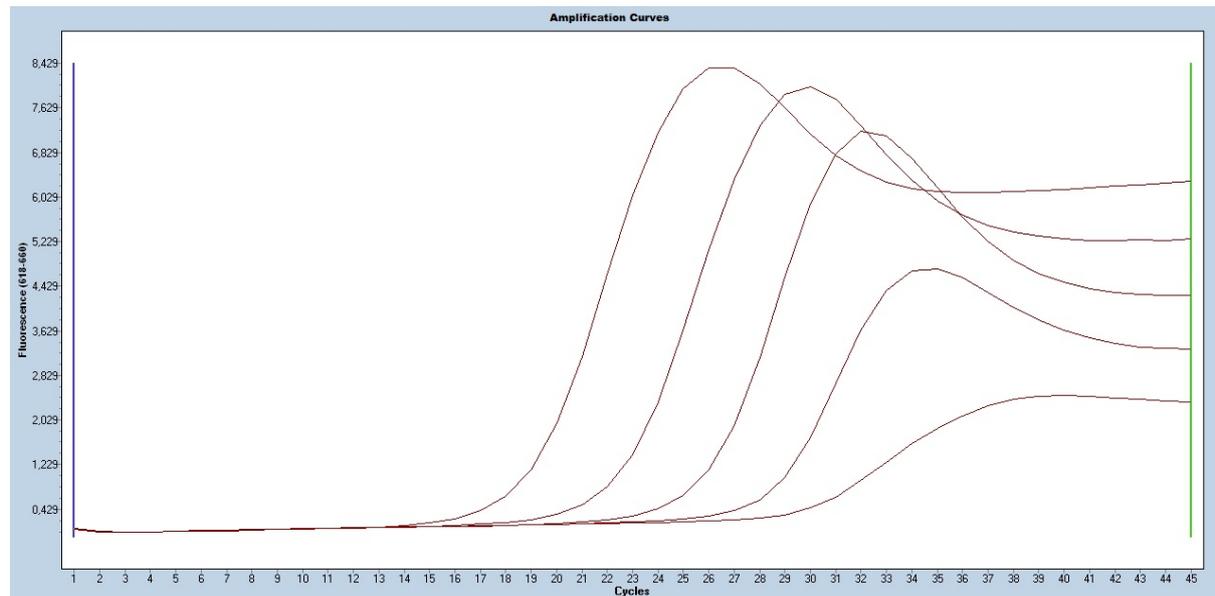


Abb. 6: Verdünnungsreihe Influenza A ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) dem LightCycler[®] 480II



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

13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Flu & RSV real-time RT-PCR ist spezifisch für Influenzaviren (Influenza A, Influenza B) und RSV. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 11):

Tab. 11: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 1, Human, strain Adenoid 71	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	Human parainfluenza virus 4b strain CH19503	-	Neisseria meningitidis Strain FAM18	-
Adenovirus 7, Human, Strain Gomen	-	Human Coronavirus 229E	-	Human Parainfluenza Virus serotype 3	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain NCTC 7465	-
<i>Bordetella parapertussis</i> Strain 12822	-	Human Metapneumovirus	-	Human Rhinovirus Genogroup A	-	Varicella Zoster Virus (Type B)	-
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	Human Coxsackie B4	-	Influenza virus infectious A/PR/8/34	-		
Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	Human Cytomegalovirus	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MGH78578	-		
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	Human parainfluenza virus 1 strain C35	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. Pneumophila	-		
Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	Human parainfluenza virus 2 strain Greer	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Strain FH of Eaton Agent	-		
<i>Acinetobacter baumannii</i> Strain 5377	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. Lari	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Adenovirus	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Adenovirus 40, Human, Strain Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> SM131	-
Adenovirus 41, Human, Strain Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i> NCTC 9750	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. novobiosepticus R22	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Rotavirus	-		
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-		
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-		
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-		
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. Fetus	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Shigella flexneri</i>	-		

13.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Flu & RSV real-time RT-PCR wurde mit verschiedenen Stämmen von Influenza A und Influenza B Viren untersucht (s. Tab. 12). Alle Influenza A und Influenza B Stämme des Probenpanels wurden mit der RIDA®GENE Flu & RSV real-time RT-PCR nachgewiesen.

Tab. 12: Analytische Reaktivitätstestung

Subtyp	Stamm	RSV	Influenza B	Influenza A
H1N1	Influenza A/Brisbane/59/2007	negativ	negativ	positiv
H1N1v	Influenza A/Bayern/63/2009	negativ	negativ	positiv
H1N1v	Influenza A/California/7/2009	negativ	negativ	positiv
H1N1v	Influenza A/California/7/2009	negativ	negativ	positiv
H1N1v	Influenza A/PR/8/34	negativ	negativ	positiv
H5N1	Influenza A/Chicken/Germany/R3294/2007	negativ	negativ	positiv
H3N2	Influenza A/Perth/16/2009	negativ	negativ	positiv
A	Human Respiratory syncytial virus Strain Long	positiv	negativ	negativ
B	Human Respiratory syncytial virus Strain L9320	positiv	negativ	negativ

Literatur

1. World Health Organisation 2009, Fact Sheet N°211, Influenza (Saisonal) 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.
5. Robert Koch Institut. Respiratorische Synzytial-Viren-Infektionen. RKI-Rategeber für Ärzte, Stand Mai 2011.
6. Thorburn K. Pre-existing disease is associated with a significantly higher risk of death in severe respiratory syncytial virus infection. Arch Dis. Child 2009, 94: 99-103.