



# 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](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

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

**RIDA® GENE Parainfluenza**  
real-time RT-PCR

Art. Nr.: PG5805  
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 Parainfluenza ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und Differenzierung von humanen Parainfluenzaviren (Parainfluenza 1, Parainfluenza 3 und Parainfluenza 2/4) aus humanem Nasen- und Rachenabstrich und Nasopharyngeal-Abstrich.

Die RIDA®GENE Parainfluenza multiplex real-time RT-PCR soll die Diagnose einer durch Parainfluenzaviren verursachten respiratorischen Infektion unterstützen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Humane Parainfluenzaviren (HPIV) sind umhüllte, einzelsträngige RNA (ss-RNA) Viren, die sowohl Infektionen der oberen als auch der unteren Atemwege verursachen. Parainfluenzaviren gehören zu der Familie der *Paramyxoviridae* und wurden in den späten 50er Jahren bei Kindern mit Entzündungen der unteren Atemwege entdeckt. Im Gegensatz zu Influenzaviren, die der Familie der *Myxoviridae* angehören, wachsen Parainfluenzaviren weniger gut in embryonierten Eiern und sie teilen auch nur wenige antigenetische Regionen mit Influenzaviren.<sup>1</sup>

Parainfluenzaviren lassen sich genetisch und antigenetisch in vier Serogruppen unterscheiden. Parainfluenzavirus 1 und 3, welche unter Respiroviren bekannt sind, und Parainfluenzavirus 2 und 4 welche zu Rubilaviren gezählt werden. Vor allem Parainfluenzavirus 1, 2 und 3, aber auch Parainfluenza 4 zählen zu den häufigsten ambulant erworbenen respiratorischen Erregern weltweit. Obwohl Parainfluenzavirus 1 und 3 bei Säuglingen, Kleinkindern, immunsupprimierten Menschen und chronisch erkrankten Menschen am häufigsten vorkommen, können Parainfluenzavirus 2 und 4 auch zu respiratorischen Infektionen führen. Obwohl sich alle vier Parainfluenza Serogruppen strukturell und biologisch kaum unterscheiden, gibt es einen klaren Zusammenhang zwischen Parainfluenzasubtyp und Art der respiratorischen Erkrankung, sowie dem saisonalen Aufkommen dieser Erreger. Parainfluenzavirus 1 und 2-Epidemien treten meist zusammen alle zwei Jahre im Herbst auf, während es jährlich im Frühling und Sommer zu Parainfluenzavirus 3-Epidemien in Nordamerika und Europa kommt.<sup>2</sup> Klinische Symptome sind, abhängig von den verschiedenen Serogruppen, unter anderem Pseudokrapp, Bronchiolitis, Pneumonie und Tracheobronchitis.<sup>1</sup> Pseudokrapp (auch: akute stenosierende Laryngotracheitis) wird primär in Kleinkindern zwischen ein und zwei Jahren detektiert und geht in den USA in 56 - 74 % aller Fälle aus einer Parainfluenza Infektion hervor. Hierbei ist eine Infektion mit Parainfluenzavirus 1 am häufigsten. Bronchiolitis kommt im ersten Lebensjahr vor und wird in 90 % der Fälle durch einen

Virus hervorgerufen. Auch wenn alle vier Serogruppen zu Bronchiolitis führen sind Parainfluenzavirus 1 und 3 am meisten beschrieben. Die durch Parainfluenzavirus verursachte Pneumonie kommt meistens in Kindern zwischen zwei und drei Jahren vor. Auch dieses klinische Bild kann durch alle vier Serogruppen verursacht werden. Patienten die keins der oben genannten klinischen Symptome zeigen werden häufig mit Tracheobronchitis diagnostiziert. 20 – 30 % der Kinder mit unteren Atemwegserkrankungen hat Tracheobronchitis, wovon 25 % durch Parainfluenzavirus 3, 1 und 2 verursacht sind. Generell kann jede Parainfluenza Serogruppe eine oder mehrere respiratorische Atemwegserkrankungen hervorrufen und in 5 – 20 % aller Infektionen der unteren Atemwege wird mehr als eine Parainfluenza Serogruppe detektiert.<sup>1</sup> Erkrankungen durch Erreger der Paramoxyviridae-Familie sind Infektionen mit den größten ökonomischen Auswirkungen. In den USA werden durch stationäre Behandlung von Parainfluenzavirus 1 und 2 Kosten in Höhe von über 186 Mio. \$ verursacht, während Ausgaben von 30 Mio. \$ durch jede Parainfluenza 1 verursachte Pseudokrapp-Epidemie entstehen.<sup>1</sup>

### 3. Testprinzip

RIDA<sup>®</sup>GENE Parainfluenza ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und Differenzierung von Parainfluenzaviren (Parainfluenza 1, Parainfluenza 3 und Parainfluenza 2/4). 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 für Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 und Parainfluenza 2/4 spezifischen Genfragmente werden anschließend mittels real-time RT-PCR amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen (HN-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 Parainfluenza 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)
- Der RIDA®GENE Parainfluenza 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 MDX (Promega)
    - QIASymphony SP/AS, QIAcube (Qiagen)
    - NucliSENS® easyMag™ (bioMérieux)
    - Magna Pure 96, Magna Pure LC2.0 (Roche)
    - m2000sp, m24sp (Abbott)
  - Real-time PCR-Gerät:

Roche:	LightCycler® 480II
Agilent Technologies:	Mx3005P
Applied Biosystems:	ABI 7500
Abbott:	m2000rt
Bio-Rad:	CFX96™
Cepheid:	SmartCycler®
QIAGEN:	Rotor-Gene Q

**Bemerkung: 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).

- 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](http://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 Reagenzien – erforderliches Zubehör) 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, sowie Nasopharyngeal-Abstrichen 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-Isolierkits oder RNA-Extraktionssystems durchführen.

Der RIDA® GENE Parainfluenza 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.

## 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 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.

## 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 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.

**Hinweis:** Bei Verwendung des SmartCycler® (Cepheid) müssen die „Man. Grenzw. Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 30.0 und für Kanal 2 bis 4 auf 5.0 eingestellt werden. In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Man. Grenzw. Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 individuell eingestellt werden müssen.

## 9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 5: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	Parainfluenza 1	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) wird benötigt
	ICR	533/580	
	Parainfluenza 3	533/610	
	Parainfluenza 2/4	618/660	
Cepheid SmartCycler®	Parainfluenza 1	Kanal 1	Stellen Sie die „Man. Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 30.0 und für Kanal 2 - 4 auf 5.0 ein*
	ICR	Kanal 2	
	Parainfluenza 3	Kanal 3	
	Parainfluenza 2/4	Kanal 4	
ABI 7500	Parainfluenza 1	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
	Parainfluenza 3	ROX	
	Parainfluenza 2/4	Cy5	
Abbott m2000rt	Parainfluenza 1	FAM	-
	ICR	VIC	
	Parainfluenza 3	ROX	
	Parainfluenza 2/4	Cy5	
Stratagene Mx3005P	Parainfluenza 1	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	HEX	
	Parainfluenza 3	ROX	
	Parainfluenza 2/4	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Parainfluenza 1	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 eingestellt sein
	ICR	Yellow	
	Parainfluenza 3	Orange	
	Parainfluenza 2/4	Red	
Bio-Rad CFX96™	Parainfluenza 1	FAM	-
	ICR	VIC	
	Parainfluenza 3	ROX	
	Parainfluenza 2/4	Cy5	

\*In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 individuell eingestellt werden müssen.

## 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/ $\mu$ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  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 * <sup>1</sup>	Siehe QAC
NTC	Negativ	Ct > 20	0

\*<sup>1</sup> 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 detektiert wird, 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
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten

Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (Parainfluenza 1) auf dem LightCycler® 480II

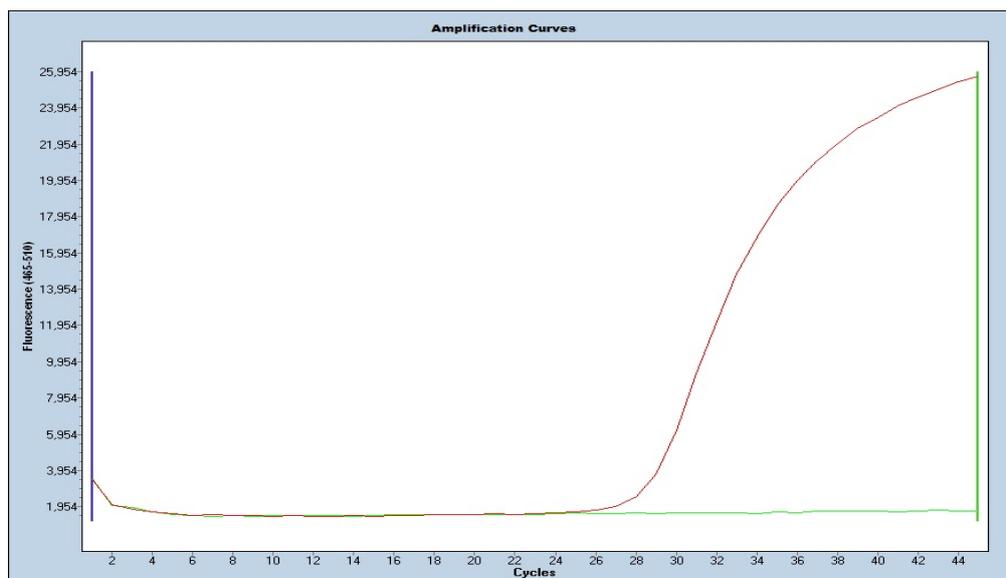


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (Parainfluenza 3) auf dem LightCycler® 480II

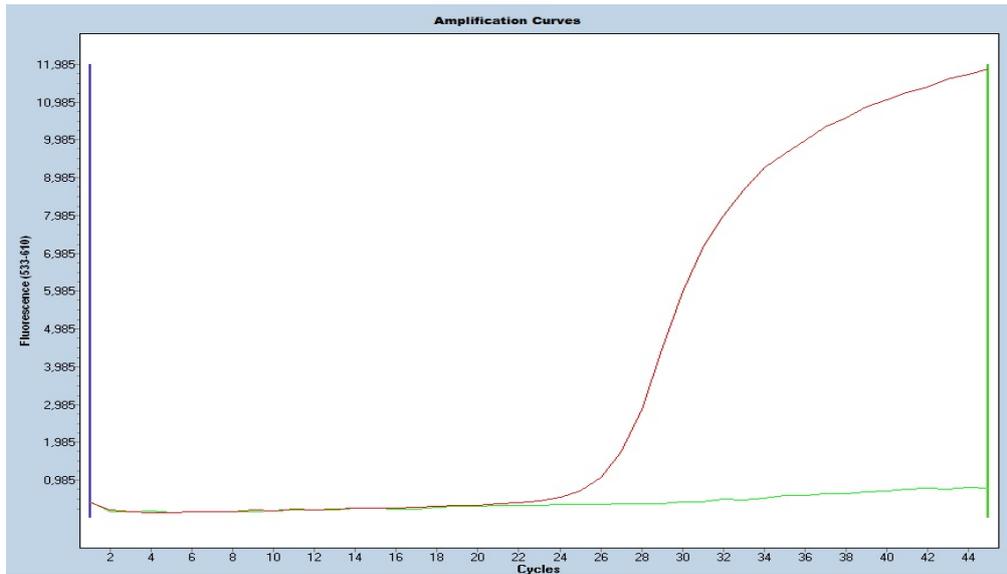
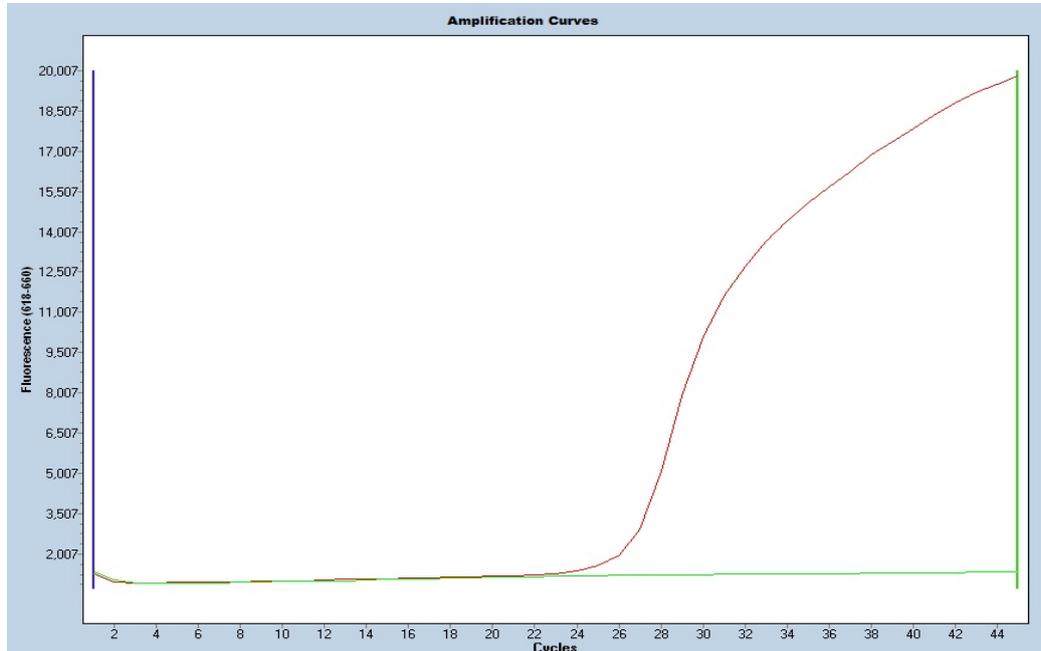


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (Parainfluenza 2/4) auf dem LightCycler® 480II



## 11. Auswertung und Interpretation

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 7.

Tab. 7: Interpretation der Ergebnisse

Zielgene				
HN-Gen (spez. für Parainfluenza 1)	HN-Gen (spez. für Parainfluenza 3)	HN-Gen (spez. für Parainfluenza 2/4)	Internal Control RNA (ICR)	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	Parainfluenza 1
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	Parainfluenza 3
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	Parainfluenza 2/4
negativ	negativ	negativ	positiv	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 Nasopharyngeal-Abstriche validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Viruslast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregion können den Nachweis neuer unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE Parainfluenza zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. 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 Analytische Sensitivität

Die RIDA<sup>®</sup> GENE Parainfluenza multiplex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 50$  RNA-Kopien/Reaktion für Parainfluenza 1, Parainfluenza 3 und Parainfluenza 2/4 (s. Abb. 4, Abb. 5, Abb. 6).

Abb. 4: Verdünnungsreihe Parainfluenza 1 ( $10^5$  -  $10^1$  RNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II

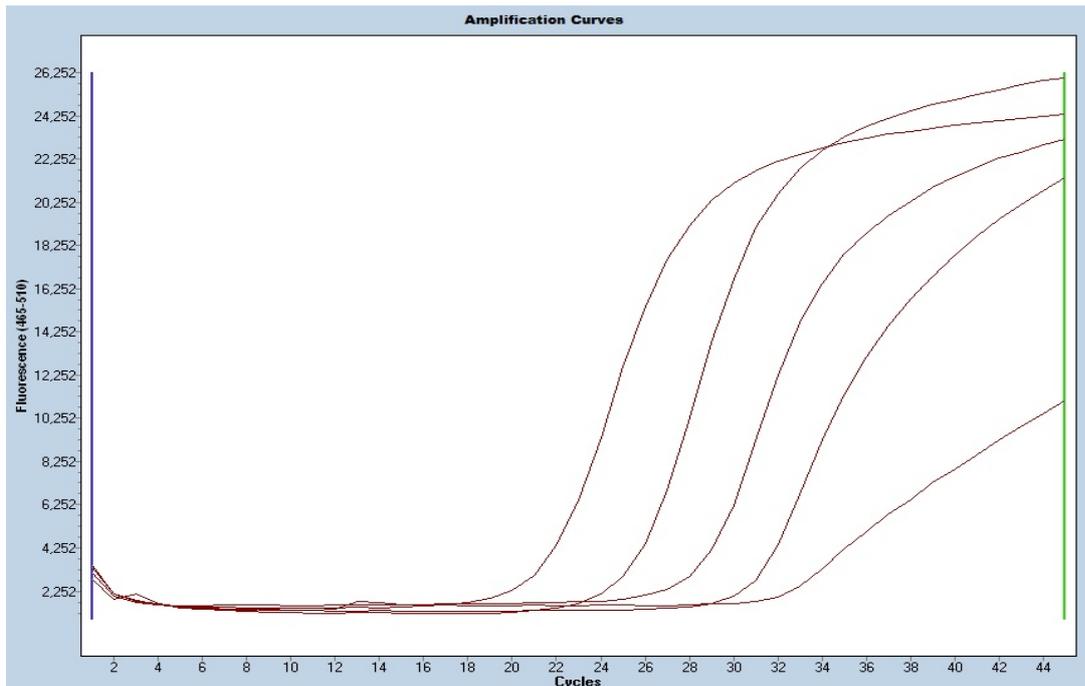


Abb. 5: Verdünnungsreihe Parainfluenza 3 ( $10^5$  -  $10^1$  RNA Kopien/ $\mu$ l) dem LightCycler<sup>®</sup> 480II

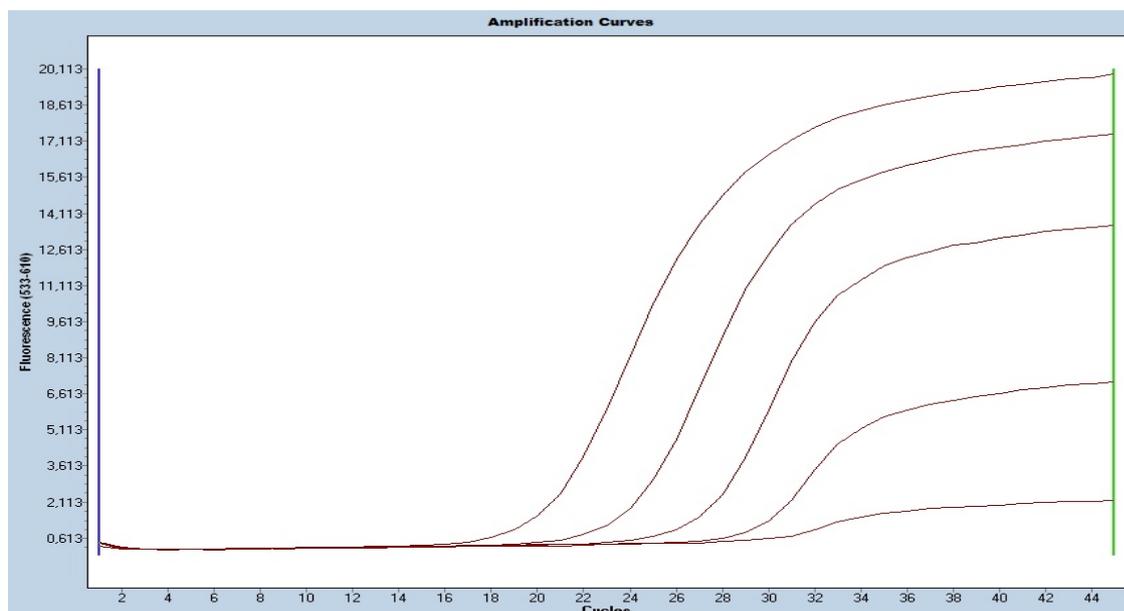
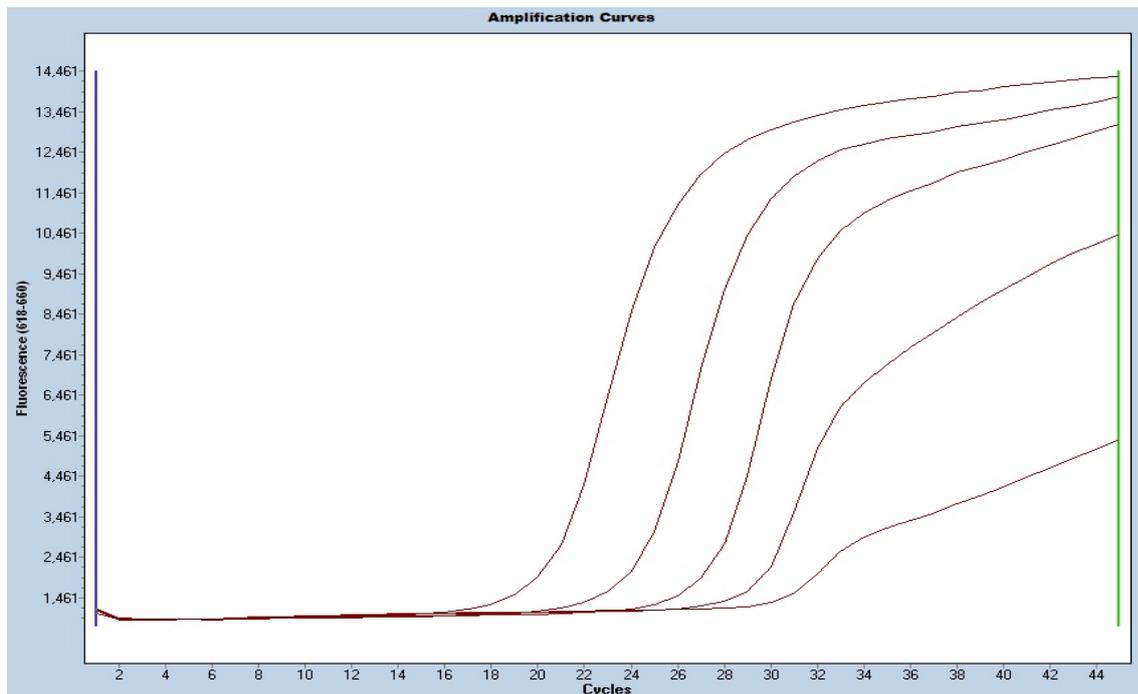


Abb. 6: Verdünnungsreihe Parainfluenza 2/4 ( $10^5$  -  $10^1$  RNA Kopien/ $\mu$ l) dem LightCycler<sup>®</sup> 480II



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

## 13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Parainfluenza real-time RT-PCR ist spezifisch für Parainfluenzaviren (Parainfluenza 1, Parainfluenza 3 und Parainfluenza 2/4). Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 8):

Tab. 8: Kreuzreaktivitätstestung

<i>Acinetobacter baumannii</i> Strain 5377	-	Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	Human Rhinovirus Genogruppe A	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Adenovirus	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	Influenza virus infectious A/PR/8/34	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> SM131	-
Adenovirus 1, Human, strain Adenoid 71	-	Human Coronavirus 229E	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain NCTC 7465	-
Adenovirus 7, Human, Strain Gomen	-	Human Coxsackie B4	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MGH78578	-	Varicella Zoster Virus (Type B)	-
<i>Bordetella parapertussis</i> Strain 12822	-	Human Cytomegalovirus	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. Pneumophila	-		
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	Human Metapneumovirus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Strain FH of Eaton Agent	-		
Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	Human respiratory syncytial virus strain Long	-	<i>Neisseria meningitidis</i> Strain FAM18	-		
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	Human respiratory syncytial virus strain 9320	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-		
Adenovirus 40, Human, Strain Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Adenovirus 41, Human, Strain Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i> NCTC 9750	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-		
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-		
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Rotavirus	-		
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-		
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. Fetus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-		
<i>Campylobacter lari</i> subsp. Lari	-	<i>Clostridium sordelli</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-		
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. novobiosepticus R22	-		

### 13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Parainfluenza real-time RT-PCR wurde mit verschiedenen Stämmen von Parainfluenza 4 untersucht (s. Tab. 9). Alle Parainfluenza 4 Stämme des Probenpanels wurden mit der RIDA®GENE Parainfluenza real-time RT-PCR nachgewiesen.

Tab. 9: Analytische Reaktivitätstestung

Subtyp	Stamm	Parainfluenza 1	Parainfluenza 3	Parainfluenza 2/4
1	Human Parainfluenza virus 1, Strain C35	positiv	negativ	negativ
2	Human Parainfluenza virus 1, Strain Greer	negativ	negativ	positiv
4a	Human Parainfluenza virus 4, Strain M25	negativ	negativ	positiv
4b	Human Parainfluenza virus 4, Strain CH 19503	negativ	negativ	positiv

### Symbolerklärungen

	Für die <i>in-vitro</i> Diagnostik
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lotnummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl der Präparationen
	Herstellungsdatum
	Hersteller

## Literatur

1. Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. Clin. Microbiol. Reviews. 2003, 16(2): 242-263.
2. Berman S. Epidemiology of acute respiratory infections in children of deveioning countries. Rev. Infect. Dis. 1991, 13:454-462.