

# ViroReal<sup>®</sup> Kit Influenza A/B

Kit Version 1.1

## Gebrauchsanweisung



CE

IVD

*In vitro*-Diagnostikum

REF

DHUV00253

Σ

50 Reaktionen















**ingenetix GmbH**  
Haidingergasse 1  
1030 Vienna, Austria  
T +43(0)1 36 198 01  
office@ingenetix.com  
www.ingenetix.com

## Inhaltsverzeichnis

1. Zweckbestimmung.....	3
2. Produktbeschreibung.....	3
3. Erregerinformation.....	3
4. Grundprinzip der one-step reverse Transkription real-time PCR.....	4
5. Kit Inhalt, Stabilität und Lagerung.....	4
6. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte.....	5
7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise.....	5
7.1. Generelle Hinweise.....	5
7.2. Spezifische Hinweise.....	5
8. Grenzen des Verfahrens.....	6
9. Vorbereitung der Proben.....	7
9.1. Probeentnahme und Lagerung.....	7
9.2. Empfohlene Extraktionsmethoden.....	7
9.3. Qualitätskontrolle für RNA-Extraktion und RT PCR-Inhibition mit IPC.....	7
9.3.1. Anwendung der IPC als Kontrolle der Extraktion und RT real-time PCR.....	7
9.3.2 Anwendung der IPC als Qualitätskontrolle für die RT PCR-Reaktion.....	7
10. Vorbereitung der real-time PCR.....	8
10.1. Pipettierschema.....	8
10.2. Programmierung des Temperaturprofils.....	9
11. Interpretation der PCR-Daten.....	10
11.1. Kontrollen.....	10
11.2. Patientenproben.....	11
12. Troubleshooting.....	12
12.1. Kein virusspezifisches Signal mit Positivkontrolle und IPC.....	12
12.2. Erreger-Signal in der Negativkontrolle.....	12
12.3. Erreger-Signal in der Negativkontrolle der Extraktion.....	12
12.4. IPC spezifisches Signal mit der Negativkontrolle und der Positivkontrolle.....	12
12.5. Kein Signal mit IPC und kein virusspezifisches Signal in Probe.....	12
13. Spezifikation und Evaluierung der Testperformance.....	13
13.1. Testperformance auf verschiedenen real-time PCR Geräten.....	13
13.2. Nachweisgrenze und Linearität.....	14
13.3. Linearität und dynamischer Messbereich.....	14
13.4. Präzision.....	14
13.5. Analytische Spezifität.....	14
13.6. Diagnostische Evaluierung.....	15
14. Literatur.....	16
15. Änderungsindex.....	16

## Erklärung der Symbole

	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Katalognummer		Hersteller
	Ausreichend für "n" Prüfungen		Temperaturgrenzwerte (Aufbewahrung bei)
	Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79 EG für <i>in-vitro</i> Diagnostika		<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten		Eindeutige Produktidentifizierung
	Vor Sonnenlicht schützen		Inhalt

## 1. Zweckbestimmung

ViroReal® Kit Influenza A/B ist ein nicht automatischer IVD Test zum qualitativen Nachweis der RNA des Matrix Protein Gens des Influenza A Virus und des Hämagglutinin Protein Gens des Influenza B Virus mittels one-step reverse Transkription real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).

Geeignete Untersuchungsmaterialien sind RNA-Extrakte isoliert aus Proben des oberen humanen Respirationstraktes (Nasenabstriche, nasopharyngeale Abstriche und oropharyngeale Abstriche).

Dieser Test ist für Patienten aller Altersgruppen mit Verdacht auf eine Infektion mit Influenzavirus A oder B geeignet und dient in Kombination mit der Krankengeschichte und zusätzlichen klinischen Informationen zur Unterstützung der Diagnose einer Influenzavirus-Infektion.

Der Test ist für den professionellen Gebrauch bestimmt und darf nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR und *in vitro* Diagnose Verfahren geschult wurde.

## 2. Produktbeschreibung

ViroReal® Kit Influenza A/B ist ein one-step reverse Transkription real-time PCR Test und detektiert RNA des Matrix Protein Gens des Influenza A Virus und des Hämagglutinin Protein Gens des Influenza B Virus.

Eine Sonden-spezifische Amplifikationskurve im Fluoreszenzkanal für FAM zeigt die Amplifikation der Influenza A Virus spezifischen RNA. Eine Sonden-spezifische Amplifikationskurve im Fluoreszenzkanal für VIC zeigt die Amplifikation der Influenza B Virus spezifischen RNA. Die interne RNA Positivkontrolle (IPC) wird im Cy5 Kanal detektiert und dient als Kontrolle der RNA Extraktion und möglicher RT-PCR Inhibition. Das Target für die RNA IPC (artifizielle Ziel RNA) wird während der Probenextraktion zugegeben.

Dieser Test wurde mit dem ABI® 7500 Fast Real-time PCR System (Fast Cycle Parameter werden nicht unterstützt, Thermo Fisher Scientific) validiert und zusätzlich mit QuantStudio™ 7 Pro (Thermo Fisher Scientific), MIC instrument (bio molecular systems) und LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics) getestet. Er eignet sich aber auch für andere real-time PCR Geräte, die Fluoreszenz im FAM, VIC und Cy5 Kanal messen und differenzieren können (z.B. QuantStudio™ 5, Mx3005P® (Agilent), qTOWER<sup>3</sup>G (Analytik Jena), cobas z 480 Analyzer (Roche)).

Bei Verwendung von PCR-Plattformen, die nicht von ingenetix getestet wurden, muss eine Evaluierung der Multiplex-PCR durchgeführt werden. Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen vor der Verwendung einer Multiplex-PCR mit den jeweiligen Farbstoffen kalibriert werden müssen.

Ingenetix ViroReal®, BactoReal®, MycoReal®, PanReal und ParoReal® Kits sind darauf optimiert mit dem gleichen Temperaturprofil den Nachweis von DNA und RNA in einem PCR Lauf zu ermöglichen.

## 3. Erregerinformation

Influenza ist eine durch Viren der Gattung Influenzavirus A, B oder C verursachte Infektionskrankheit bei Menschen. Influenzaviren sind umhüllte Viren mit einer einzelsträngigen, segmentierten RNA negativer Polarität. Auslöser der Grippeepidemien und Pandemien sind hauptsächlich Influenzaviren der Gruppen A und seltener B, da diese ihre antigenen Oberflächenmoleküle Hämagglutinin und Neuraminidase ständig verändern. Daher werden sie bei einer erneuten Infektion vom Immunsystem nicht mehr oder nur schlecht erkannt. Influenzaviren B und C infizieren fast ausschließlich den Menschen, während Influenzavirus A viele Warmblüter befällt. Influenzavirus C spielt bei Erkrankungen des Menschen keine relevante Rolle, da dieser nur zu milden Erkrankungen führt.

## 4. Grundprinzip der one-step reverse Transkription real-time PCR

Der Test basiert auf der Multiplex one-step reverse Transkription real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mittels 5'-Nuklease-Assay Technologie. Dazu wird im ersten Schritt ein spezifischer RNA-Bereich in cDNA umgeschrieben und anschließend die DNA amplifiziert und die generierten PCR-Produkte gleichzeitig mit Hilfe fluoreszenz-markierter Oligonukleotid-Sonden detektiert. Dies ermöglicht den sequenzspezifischen Nachweis von PCR Amplifikaten.

Während der PCR werden Primer mittels *Taq*-Polymerase verlängert und die mit dem Target hybridisierten Sonden durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase gespalten. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz der Sonde mit jedem PCR-Zyklus an. Die Veränderung der Fluoreszenz der verschiedenen Farbstoffe wird im real-time PCR Gerät im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus bei verschiedenen Fluoreszenzwellenlängen erfasst.

Der C<sub>q</sub>-Wert (C<sub>q</sub> = Quantification cycle, C<sub>t</sub> = Cycle threshold, C<sub>p</sub> = Crossing point) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

## 5. Kit Inhalt, Stabilität und Lagerung

Tabelle 1

Beschriftung	Inhalt	Menge	Lagerung
Influenza A/B Assay + IPC3 Mix (grüner Verschluss)	Primer + Sonden für Detektion von <ul style="list-style-type: none"> <li>- Influenza A Virus (FAM)</li> <li>- Influenza B Virus (VIC)</li> <li>- RNA IPC (Cy5)</li> </ul>	1 x 50 µl	-25 bis -15 °C
IPC-Target (RNA) (oranger Verschluss)	Target für RNA IPC (internes RNA Positivkontrollsystem)	1 x 200 µl	-25 bis -15 °C
Influenza A/B Positive Control (roter Verschluss)	RNA Positivkontrolle (ca. 1000 Targetkopien/µl)	1 x 300 µl	-25 bis -15 °C
RNA Reaction Mix (weißer Verschluss)	PCR Reaktionsmix für RNA Amplifikation	1 x 250 µl	-25 bis -15 °C
Nuclease-free water (blauer Verschluss)	Nuclease-freies Wasser	1 x 1000 µl	-25 bis -15 °C

**RNA Reaction Mix:** Der im Kit enthaltene Master-Mix wurde für eine zuverlässige, hochempfindliche Real-Time-PCR mit reverser, one-step Transkription entwickelt, auch bei Vorhandensein gängiger Reaktionsinhibitoren. Der Master Mix enthält eine thermostabile MMLV-Reverse-Transkriptase, einen RNase-Inhibitor, eine hochgereinigte *Taq*-Polymerase für schnelle hot-start-PCR, dNTPs, ROX™ -Farbstoff (passive Referenz) und Pufferkomponenten - Additive, die für den Umgang mit RT-PCR-Inhibitoren optimiert sind.

### Lieferung und Haltbarkeit

Die Lieferung des Kits erfolgt auf Trockeneis. Bei sachgemäßer Lagerung sind die Kitkomponenten bis zum angegebenen Ablaufdatum haltbar. Dies gilt auch nach Anbruch. Kit vor Licht geschützt lagern.

### Qualitätskontrolle Freigabetestung

In Übereinstimmung mit dem ISO 13485 zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von ingenetix wird jede Charge anhand vorgegebener Spezifikationen getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten. Die Qualitätskontrolle erfolgt mit einer artifiziellen RNA, welche Teile der Erreger RNA repräsentiert. Die RNA-Konzentration wurde mit einer Standardkurve eines Plasmids, welche Teile der Erreger Sequenz enthält, bestimmt.

## 6. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Reagenzien und Laborgeräte für RNA-Extraktion, die für die Extraktion des angeführten Probenmaterials geeignet sind (siehe 9. Vorbereitung der Proben)
- Nuklease-freies Wasser
- Puderfreie Laborhandschuhe (Einweghandschuhe)
- Pipetten (einstellbar)
- Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße
- Real-time PCR Gerät, welches Fluoreszenz im FAM, VIC und Cy5 Kanal messen und differenzieren kann (siehe 2. Produktbeschreibung)
- Optische 96 Well Reaktionsplatten oder Reaktionsgefäße mit zugehörigem (optischen) Verschlussmaterial
- Optional: Laminar-Flow-Sterilbank
- Optional: PCR-Workstation

## 7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise

### 7.1. Generelle Hinweise

- In-vitro-Diagnostikum: Dieses Produkt darf nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR und *in vitro* Diagnose Verfahren geschult wurde.
- Der Transport von klinischen Proben muss den örtlichen Vorschriften für den Transport von Biologischen Stoffen entsprechen.
- Proben sollten als potenziell infektiös behandelt werden, gemäß den Vorschriften für sicheres Laborarbeiten. Tragen Sie puderfreie Einweghandschuhe bei der Handhabung von klinischem Probenmaterial und Kitreagenzien.
- Probenmaterial, Reagenzien und Abfall müssen gemäß lokalen Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Eine unsachgemäße Entnahme, Beförderung oder Lagerung der Proben kann die Fähigkeit des Assays zum Nachweis der Zielsequenzen beeinträchtigen.
- Die Qualität der RNA hat großen Einfluss auf die Testperformance. Es muss sichergestellt sein, dass das verwendete RNA-Extraktionssystem mit real-time PCR Technologie kompatibel ist.
- Das real-time PCR Gerät sollte regelmäßig kalibriert, gewartet und gereinigt werden.
- Kitkomponenten sollten vor Licht geschützt werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen sollten nicht vermischt werden. Beachten Sie das Ablaufdatum des Kits.

### 7.2. Spezifische Hinweise

Es muss ein Arbeitsablauf eingehalten werden, der falsch positive Ergebnisse aufgrund von Detektion kontaminierender RNA verhindert.

#### Empfohlene Maßnahmen zur Vermeidung von RNA-Kontaminationen:

- Separat getrennte Arbeitsbereiche sind für die Aufbereitung des Probenmaterials, Vorbereitung der real-time PCR und Amplifikation nötig. Materialien und Geräte müssen den einzelnen Arbeitsplätzen zugeordnet sein, um den Arbeitsablauf von Prä- zu Post-PCR im Labor zu gewährleisten.
- Labortische und Hilfsmittel müssen regelmäßig gereinigt werden.
- Die Probenaufbereitung sollte in einer Laminar-Flow-Sterilbank erfolgen. Laminar-Flow-Sterilbank regelmäßig in allen Bereichen reinigen.
- Die Vorbereitung der real-time PCR sollte in einer PCR-Workstation erfolgen.
- Nach Möglichkeit Verbrauchsmaterialien und Pipetten in der Laminar-Flow-Sterilbank und in der PCR-Workstation belassen.
- Die Verwendung von sterilen aerosol-resistenten Pipettenspitzen ist erforderlich.
- Nur RNA-freie Verbrauchsmaterialien verwenden.
- Labormantel tragen.
- Nur mit puderfreien Einweghandschuhen arbeiten, beim Anziehen die Handfläche und Finger der Handschuhe außen nicht berühren. Handschuhe öfters wechseln. Um Hautkontakt zu vermeiden, Handschuhe über die Ärmel des Labormantels ziehen. Eventuell Einweg-Ärmelschoner verwenden.
- Nicht den Rand oder das Gewinde von offenen Reagenzgefäßen berühren.

- Beim Hantieren mit den Proben und der Positivkontrolle ist Vorsicht geboten, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Lagern Sie positives oder potenziell positives Material separat von allen anderen Reagenzien.
- Für eine zulässige Interpretation der Ergebnisse muss eine Negativkontrolle während der RNA-Extraktion (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial) mit einbezogen werden, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kontamination mit Erreger RNA während der Extraktion ausschließen zu können.
- Optional: In jedem PCR-Lauf kann eine PCR-Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser statt Probe, NTC) mitgeführt werden.

## 8. Grenzen des Verfahrens

- Zuverlässige Ergebnisse mit diesem Test sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Entnahme, Transport und Lagerung der Proben und eines geeigneten RNA-Extraktionsverfahrens gewährleistet.
- Mit diesem Kit wurde die RNA Extraktion und Detektion von Influenza A Virus und Influenza B Virus aus nasopharyngealen Abstrichen validiert. Die Testperformance mit anderen klinischen Probentypen wurde bislang noch nicht bewertet.
- Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit einer Influenza A Virus oder Influenza B Virus Infektion nicht aus, da die Ergebnisse durch unsachgemäße Probenentnahme, technische Fehler, Probenverwechslung oder eine Erregerzahl unterhalb der Nachweisgrenze beeinträchtigt werden können. PCR Inhibitoren können zu einem ungültigen Ergebnis führen.
- Obwohl für diesen Kit hochspezifische Primer und Sonden gewählt wurden, können eventuell vorhandene Sequenzvariabilitäten in der Ziel-Region von bislang nicht bekannten klinischen Subtypen zu falsch-negativen oder weniger sensitiven Ergebnissen führen.
- Ergebnisse sollten mit anderen Labordaten und klinischen Parametern im Kontext interpretiert werden.

## 9. Vorbereitung der Proben

ViroReal® Kit Influenza A/B eignet sich für die Untersuchung von RNA-Extrakten aus Proben des humanen Respirationstraktes (Nasenabstriche, nasopharyngeale Abstriche und oropharyngeale Abstriche).

Die Probenaufbereitung sollte mit den empfohlenen Maßnahmen zur Vermeidung von RNA-Kontaminationen erfolgen (siehe Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise). Es muss immer eine RNA-Extraktion Negativkontrolle (NTC) mitgeführt werden (Wasser anstelle von Probenmaterial).

Gereinigte RNA sollte bei -25 bis -15 °C oder bei -80 bis -60 °C gelagert werden.

### 9.1. Probeentnahme und Lagerung

Proben des Respirationstraktes können in Mikrozentrifugenröhrchen aufbewahrt werden. Abstriche werden entweder trocken oder in isotoner Kochsalzlösung (0,9% NaCl, nicht im Kit enthalten) gelagert. Abstriche können mit für PCR-ggeeignetes Abnahmematerial (z.B. sterile Polyester oder Rayon-Tupfer mit Aluminium oder Plastikstiel) abgenommen werden.

Es wird empfohlen, die Proben sofort nach der Entnahme zu verarbeiten. Lagern Sie die Proben bei 2-8 °C für nicht länger als 48 Stunden. Frieren Sie die nativen Proben nicht vor der Extraktion ein. Proben in Lysepuffer können eingefroren werden.

### 9.2. Empfohlene Extraktionsmethoden

Stellen Sie sicher, dass das angewendete Extraktionssystem nicht mit RNA von Erregern kontaminiert ist, welche mit ViroReal® Kit Influenza A/B nachgewiesen werden. Extrahieren Sie die Probe mit einem RNA-Extraktionssystem, das mit der RT real-time PCR Technologie kompatibel ist und für die Extraktion des Probenmaterials geeignet ist. Extrahieren Sie RNA aus 140-200 µl Probe (je nach Extraktionsmethode) und eluieren Sie in ca. 50 µl.

#### Für manuelle Extraktion empfohlen

- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Bei Verwendung von Extraktionsverfahren, die nicht von ingenetix empfohlen werden, muss eine Evaluierung der Extraktionsmethode durchgeführt werden.

### 9.3. Qualitätskontrolle für RNA-Extraktion und RT PCR-Inhibition mit IPC

Das RNA IPC System (internes RNA-Positivkontrollsystem) dient als Kontrolle für die RNA-Extraktion, identifiziert eine mögliche RT PCR-Inhibition und bestätigt die Integrität der Kit-Reagenzien.

Hierfür wird eine artifizielle RNA (IPC-Target (RNA), ca.  $5 \times 10^5$  Kopien/µl) während der Extraktion hinzugefügt.

**Hinweis:** Die Cq-Werte der IPC sind abhängig von der Extraktionsmethode und von der Art des Probenmaterials. Negative Proben sollten Cq-Werte der IPC zwischen 27-30 zeigen. Die verwendete Extraktionsmethode muss dementsprechend mit Probenmaterial validiert werden. Setzen Sie das IPC-Target (RNA) frisch verdünnt (1:10 mit Nuklease-freiem Wasser) in die Extraktion ein, falls bei der Validierung mit Proben Cq Werte < 27 ermittelt werden.

#### 9.3.1. Anwendung der IPC als Kontrolle der Extraktion und RT real-time PCR

Das IPC-Target (RNA) wird während der Extraktion zugesetzt.

→ Pipettieren Sie pro Probe 1 µl IPC-Target (RNA) (oranjer Verschluss) direkt zum entsprechenden Volumen an Lysepuffer (oder Zugabe zur Probe nachdem der Lysepuffer zur Probe pipettiert wurde) und setzen Sie dann die Extraktion fort.

**Achtung:** Das IPC-Target (RNA) darf nicht direkt dem Probenmaterial in Abwesenheit von Lysepuffer zugesetzt werden, da es abgebaut werden könnte. Es muss zum Lysepuffer zugegeben werden.

#### 9.3.2 Anwendung der IPC als Qualitätskontrolle für die RT PCR-Reaktion

Wenn das IPC-Target (RNA) nicht während der Extraktion zugegeben wurde, kann es zu einem späteren Zeitpunkt dem PCR-Mastermix zugegeben werden.

→ Verdünnen Sie das IPC-Target (RNA) 1:100 mit Nuklease-freiem Wasser und geben Sie 1 µl der Verdünnung/PCR-Reaktion hinzu.

**Achtung:** Das IPC-Target (RNA) darf dem Mastermix nicht unverdünnt zugesetzt werden (Inhibierung der PCR).

## 10. Vorbereitung der real-time PCR

- Pro PCR-Lauf müssen eine Positivkontrolle (roter Verschluss), eine Negativkontrolle der RNA-Extraktion und optional eine PCR-Negativkontrolle (NTC, z.B. Nuklease-freies Wasser) mitgeführt werden.
- Generell wird empfohlen, Proben in Duplikaten zu analysieren, um die Nachweiswahrscheinlichkeit zu erhöhen und die Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern.
- Am besten die RNA unmittelbar nach der Extraktion verwenden (immer auf Eis lagern). Alternativ kann RNA verwendet werden, die bei -80 °C bis -15 °C gelagert wurde. RNA auf Eis auftauen, vermeiden Sie, diese längere Zeit auf Raumtemperatur zu belassen und frieren Sie die RNA unmittelbar nach Gebrauch wieder ein.
- Unmittelbar vor der Verwendung den RNA Reaktionsmix auftauen und 2- bis 3-mal durch Invertieren des Röhrchens mischen, um eine homogene Lösung zu erhalten. Der RNA-Reaktionsmix gefriert nicht bei -20 °C, aber es kann zur Gelbildung kommen. Der RNA Reaktionsmix sollte nicht auf Raumtemperatur erwärmt werden. Die anderen Kitkomponenten müssen vor dem Ansetzen des Master Mixes vollständig bei Raumtemperatur auftauen. Nach dem Auftauen werden die einzelnen Komponenten vorsichtig gemischt, kurz mit niedriger Umdrehungszahl zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Den Master Mix für die RT-PCR auf Eis ansetzen.
- **Positivkontrolle**  
→ Setzen Sie 10 µl Positivkontrolle ein (roter Verschluss). Positivkontrolle immer zuletzt pipettieren. Influenza A/B Positivkontrolle ist eine Mischung von *in vitro* synthetisierter RNA. Sie enthält das RNA Fragment des Influenza A Virus und des Influenza B Virus mit jeweils einer Konzentration von ca. 10<sup>3</sup> Kopien/µl. Sie muss bei -20 °C gelagert werden. Positivkontrolle vor Gebrauch vorsichtig mischen, nicht vortexen. Um wiederholte Einfrier- / Auftauzyklen zu vermeiden, kann die Positivkontrolle bei mehrmaliger Benutzung am selben Tag bei 4 °C zwischengelagert werden.

### 10.1. Pipettierschema

		<b>Pro Probe</b>
<b>Ansetzen Master Mix</b> (gut durchmischen)	Nuclease-free Water*	4,0 µl
	RNA Reaction Mix	5,0 µl
	Influenza A/B + IPC3 Assay Mix	1,0 µl
	<b>Gesamtvolumen Master Mix</b>	<b>10,0 µl</b>
<b>Ansetzen PCR-Reaktion</b>	Master Mix	10,0 µl
	RNA-Probe*	10,0 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,0 µl</b>

\*10 µl Probe kann verwendet werden. Bei Verwendung eines anderen Volumens als 10 µl muss das Volumen mit Nuklease-freiem Wasser entsprechend angepasst werden.

→ **Falls das IPC-Target (RNA) nicht während der Extraktion zugegeben wurde:** Verdünnen Sie das IPC-Target (RNA) frisch 1:100 mit Nuklease-freiem Wasser und geben Sie 1 µl pro Probe direkt zum Master Mix zu. In diesem Fall dient die IPC zur Qualitätskontrolle der RT real-time PCR.

**Achtung:** Bei Verwendung von unverdünntem IPC-Target (RNA) wird die RT-PCR Reaktion möglicherweise inhibiert.

- Bereiten Sie den Master Mix entsprechend der Probenanzahl vor, berechnen Sie dabei ein zusätzliches Volumen von ca. 10% für die Berücksichtigung des Pipettierverlusts.
- Pipettieren Sie pro Probe jeweils 10 µl des vorbereiteten Master Mixes in das Well der optischen Reaktionsplatte.
- Geben Sie anschließend 10 µl der extrahierten Probe oder der Kontrollen zu. Pipettieren Sie die Positivkontrolle zum Schluss.
- Verschließen Sie die Platte mit einem geeigneten optischen Verschlussmaterial.
- Vortexen Sie die verschlossene Platte für ein 1-2 Sekunden und zentrifugieren Sie die Platte kurz ab.



## 10.2. Programmierung des Temperaturprofils

Weitere Informationen zur Programmierung der PCR-Geräte finden Sie im jeweiligen Benutzerhandbuch des Herstellers. Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen vor der Verwendung einer Multiplex-PCR mit den jeweiligen Farbstoffen kalibriert werden müssen.

**Probenvolumen:** 20 µl

**Ramp speed:** Ohne "fast cycling" Parameter für ABI® 7500 Fast Instrument, QuantStudio™ (Thermo Fisher Scientific)

Program 1	Program 2	Program 3
Cycles: 1 Analysis: None	Cycles: 1 Analysis: None	Cycles: 45 Analysis: Quantification Acquisition at 60 °C
50 °C	95 °C 2 min	95 °C 5 sec 60 °C 1 min
15 min		

**Ad Program 1:** Dieses Temperaturprofil kann für alle ingenetix ViroReal®, BactoReal®, MycoReal®, ParoReal® und PanReal Kits zum Nachweis von RNA oder DNA verwendet werden.

**Ad Program 2:** Das bisherige Temperaturprofil mit 20 sec in Programm 2 kann nach wie vor verwendet werden.

### Auswahl der Detektionskanäle

**FAM Kanal:** Detektion von Influenza A Virus

**VIC Kanal:** Detektion von Influenza B Virus

**Cy5 Kanal:** Detektion von IPC

**Für ABI® 7500 Instrument, QuantStudio™ 5/6/7 (Thermo Fisher Scientific), Mx3005P® (Agilent)**

FAM-TAMRA

VIC-NONE

Cy5-NONE

Passiver Referenzfarbstoff: ROX

**Für MIC Instrument (bio molecular systems)**

FA: Green

VIC Yellow

Cy5 Red

Passiver Referenzfarbstoff: kein ROX nötig

**Für cobas z 480 Analyzer / LightCycler® 480 II (Roche):**

Detection format: 3 Color Hydrolysis Probe

FAM: Anregung bei 465 nm, Emission bei 510 nm

VIC: Anregung bei 540 / 533 nm, Emission bei 580 nm

Cy5: Anregung bei 610 / 618 nm, Emission bei 670 / 660 nm

Passiver Referenzfarbstoff: kein ROX nötig

Die Color Compensation für FAM und VIC muss nach der Analyse von Cy5 aus der Roche Datenbank ausgewählt werden.

## 11. Interpretation der PCR-Daten

Für die Analyse der PCR-Ergebnisse wählen Sie die Fluoreszenzdarstellungs-Optionen FAM und VIC Kanal für das Erreger Target und Cy5 Kanal für die IPC.

Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen bei der Verwendung einer Multiplex-PCR eine Color Compensation benötigen.

**Wichtig:** Die Proben sollten sowohl in der logarithmischen (Roche Gerät: Abs Quant/Fit Points) als auch linearen Ansicht überprüft und mit der Negativkontrolle verglichen werden.

Überprüfen Sie neben den Cq-Werten auch die Amplifikationskurven und passen Sie gegebenenfalls den Threshold (noise band) an. Nachdem Sie die neuen Einstellungen gespeichert haben, exportieren Sie die Daten. Im Falle des cobas z 480 Analyser exportieren Sie die Tabellen pro Farbstoff.

Die Bewertung der Testergebnisse klinischer Proben sollte erst durchgeführt werden, nachdem die Daten der Positiv- und Negativkontrollen und der IPC überprüft und für valid befunden worden sind. Wenn die Resultate der Kontrollen nicht valid sind, können die Patientenergebnisse nicht interpretiert werden.

### Negative Proben:

Proben ohne Amplifikationskurven (keine Cq-Werte, „undetermined“) werden negativ gewertet. Bei diesen Proben wurde keine RNA nachgewiesen, da keine Infektion mit den untersuchten Erregern vorliegt oder die Erreger RNA-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt.

### Positive Proben:

Proben mit Cq-Werten < 45 im Fluoreszenzkanal für das Erreger Target werden positiv gewertet.

Tabelle 2 zeigt die Kriterien für valide positive und negative Kontrollen. Tabelle 3 zeigt die Interpretation der Daten mit klinischen Proben.

### 11.1. Kontrollen

**Tabelle 2** Kriterien für valide Kontrollen, wenn das IPC-Target (RNA) während der Extraktion zugegeben wurde

	Cq FAM Kanal Influenza A	Cq VIC Kanal Influenza B	Cq Cy5 Kanal IPC <sup>1</sup>	Interpretation	Vorgehensweise
<b>Positivkontrolle</b>	<27	<27	Negativ	Valid	-
<b>Positivkontrolle</b>	Negativ	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.1
<b>Positivkontrolle</b>	<27	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.1
<b>Positivkontrolle</b>	Negativ	<27	Negativ	Invalid	Siehe 12.1
<b>Negativkontrolle Extraktion der</b>	Negativ	Negativ	27-30 <sup>2</sup>	Valid	-
<b>Negativkontrolle Extraktion der</b>	Negativ	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.1
<b>Negativkontrolle Extraktion der</b>	Positiv	Positiv	27-30 <sup>2</sup>	Invalid	Siehe 12.3
<b>Negativkontrolle Extraktion der</b>	Positiv	Negativ	27-30 <sup>2</sup>	Invalid	Siehe 12.3
<b>Negativkontrolle Extraktion der</b>	Negativ	Positiv	27-30 <sup>2</sup>	Invalid	Siehe 12.3
<b>NTC PCR (optional)</b>	Negativ	Negativ	Negativ	Valid	-
<b>NTC PCR (optional)</b>	Positiv	Positiv	Negativ	Invalid	Siehe 12.2
<b>NTC PCR (optional)</b>	Negativ	Positiv	Negativ	Invalid	Siehe 12.2
<b>NTC PCR (optional)</b>	Positiv	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.2

<sup>1</sup> Falls das IPC-Target (RNA) direkt zum Mastermix zugegeben wurde, müssen alle Proben im Cy5 Kanal positiv sein.

<sup>2</sup> Die Cq-Werte der IPC sind abhängig von der Extraktionsmethode und sollten Cq Werte zw. 27-30 zeigen (siehe 9. Vorbereitung der Proben).

## 11.2. Patientenproben

Proben mit positiven Cq-Werten sind als positiv zu bewerten, siehe Tabelle 3.

**Tabelle 3** Interpretation von Daten klinischer Proben

	Cq FAM Kanal Influenza A	Cq VIC Kanal Influenza B	Cq Cy5 Kanal IPC	Interpretation	Vorgehensweise
<b>Probe</b>	Negativ	Negativ	27-30 <sup>1</sup>	Negativ	-
<b>Probe</b>	Positiv	Positiv	Positiv/Negativ <sup>2</sup>	Positiv für Influenza A Virus + Influenza B Virus	-
<b>Probe</b>	Positiv	Negativ	Positiv/Negativ <sup>2</sup>	Positiv für Influenza A Virus	-
<b>Probe</b>	Negativ	Positiv	Positiv/Negativ <sup>2</sup>	Positiv für Influenza B Virus	-
<b>Probe</b>	Negativ	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 12.5

<sup>1</sup> Das positive Signal der IPC schließt eine mögliche PCR-Inhibition aus. Die IPC Cq-Werte sollten jedoch zwischen den Proben vergleichbare Ergebnisse zeigen. Eine Verschiebung der Cq-Werte kann auf eine partielle Inhibition hindeuten. Die Cq-Werte der IPC sind abhängig von der Extraktionsmethode und sollten Cq Werte zw. 27-30 zeigen (siehe 9. Vorbereitung der Proben).

<sup>2</sup> Eine hohe Erregerkonzentration in der Probe kann zu einem reduzierten oder negativen Signal der IPC führen.

Im Fall von invaliden Daten muss die Analyse mit der restlichen oder einer frisch extrahierten RNA-Probe wiederholt werden (siehe 12. Troubleshooting).

## 12. Troubleshooting

### 12.1. Kein virusspezifisches Signal mit Positivkontrolle und IPC

- Fehlerhafte Programmierung des Temperaturprofils oder fehlerhafte Einstellung der Detektionskanäle am real-time PCR Gerät.
  - Vergleichen Sie das Temperaturprofil und die Einstellung der Detektionskanäle mit den Angaben im Protokoll.
- Fehler in der Zusammensetzung der PCR-Reaktion.
  - Überprüfen Sie die Pipettierschritte an Hand des Pipettierschemas und wiederholen Sie die PCR falls nötig.
- Die RNA ist möglicherweise abgebaut.
- Das IPC-Target (RNA) wurde unverdünnt direkt zum Mastermix gegeben und nicht frisch 1:100 verdünnt. Die PCR Reaktion ist dadurch inhibiert.
  - Stellen Sie eine frische 1:100 Verdünnung des IPC-Target (RNA) her und wiederholen Sie die PCR.
- Es wurde keine Positivkontrolle zugegeben.
  - Falls alle klinischen Proben negativ sind, wiederholen Sie die PCR.
- Zur ausschließlichen Kontrolle der RT real-time PCR muss das IPC-Target (RNA) 1:100 frisch verdünnt zum Mastermix zugegeben werden. Falls die Zugabe des IPC-Target (RNA) vergessen wurde:
  - Stellen Sie eine frische 1:100 Verdünnung der RNA IPC her und wiederholen Sie die PCR.
- Zur Kontrolle der RNA Extraktion und RT real-time PCR muss das unverdünnte IPC-Target (RNA) während der Extraktion zum Lysepuffer zugegeben werden. Falls das IPC-Target (RNA) vergessen wurde:
  - Wiederholen Sie die RNA Extraktion.

### 12.2. Erreger-Signal in der Negativkontrolle

- Es kam zu einer Kontamination während der Vorbereitung der RT-PCR.
  - Wiederholen Sie die RT-PCR mit neuen Reagenzien in Replikaten.
  - Pipettieren Sie die Positivkontrolle zuletzt.
  - Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

### 12.3. Erreger-Signal in der Negativkontrolle der Extraktion

- Es kam zu einer Kontamination während der Extraktion.
  - Wiederholen Sie die RNA-Extraktion und RT-PCR unter Verwendung neuer Reagenzien.
  - Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

### 12.4. IPC spezifisches Signal mit der Negativkontrolle und der Positivkontrolle

- IPC-Target (RNA) wurde während der Extraktion zum Lysepuffer zugegeben, aber es gibt IPC spezifisches Signal mit der Negativkontrolle und der Positivkontrolle: Kontamination mit dem IPC-Target (RNA).
  - Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

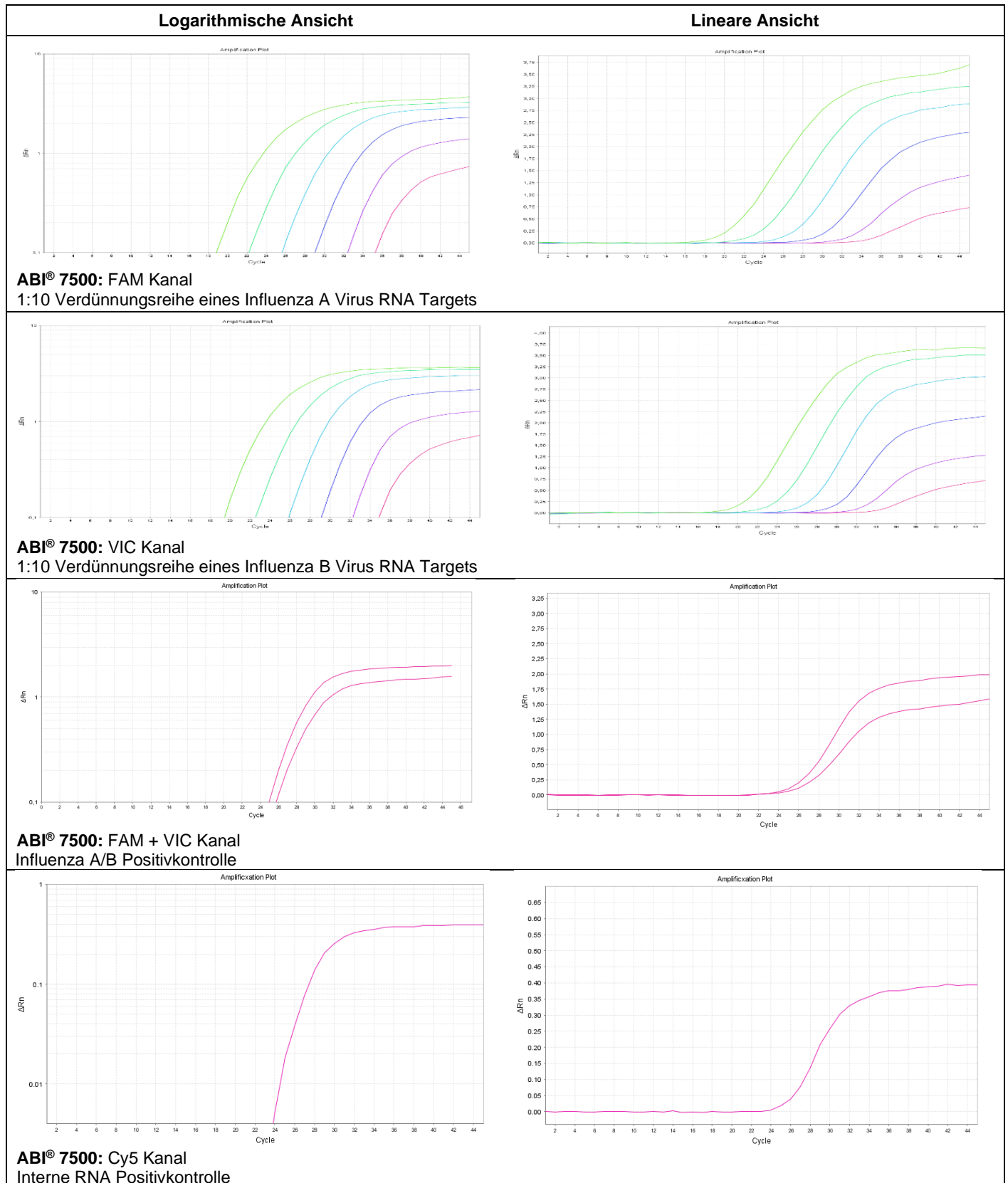
### 12.5. Kein Signal mit IPC und kein virusspezifisches Signal in Probe

- Falsche Zuordnung der Detektionskanäle mit der Probe
  - Überprüfen Sie die richtige Einstellung der Detektoren.
- Falsche RT-PCR Bedingungen.
  - Überprüfen sie die RT-PCR Bedingungen und wiederholen Sie die RT-PCR, falls nötig.
- Die RNA ist möglicherweise abgebaut.
- Falls das IPC-Target (RNA) während der Extraktion zugegeben wurde:
  - RT-PCR Inhibierung könnte vorliegen.
  - RNA Extraktion ist fehlgeschlagen.
  - Das IPC-Target (RNA) wurde nicht zum Lysepuffer der Probe pipettiert.
  - Die extrahierte Probe wurde nicht zur RT-PCR Reaktion zugegeben.
  - Eine Aussage ist nicht möglich. Überprüfen Sie, ob eine empfohlene RNA-Extraktionsmethode verwendet wurde und überprüfen Sie die einzelnen Arbeitsschritte der RNA-Extraktion.
  - Können keine Bedienungsfehler bei der RNA Extraktion nachvollzogen werden, empfiehlt es sich, die RT-PCR mit geringeren Mengen an RNA-Eluat (1/5 oder 1/10 des Probenvolumens + das entsprechende Volumen an Nuklease-freiem Wasser) zu wiederholen.

## 13. Spezifikation und Evaluierung der Testperformance

### 13.1. Testperformance auf verschiedenen real-time PCR Geräten

Abbildung 1 zeigt die Performance von ViroReal® Kit Influenza A/B mit dem ABI® 7500 Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific).



**Abbildung 1** Performance des ViroReal® Kit Influenza A/B mit ABI® 7500

Dieser Test wurde mit dem ABI® 7500 Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) validiert und zusätzlich mit dem LightCycler® 480 Instrument II (Roche), MIC instrument (bio molecular systems) und QuantStudio™ 7 Pro (Thermo Fisher Scientific) getestet, ist aber auch mit anderen real-time PCR Geräten kompatibel, die Fluoreszenz im FAM, VIC und Cy5 Kanal detektieren und differenzieren können.

### 13.2. Nachweisgrenze und Linearität

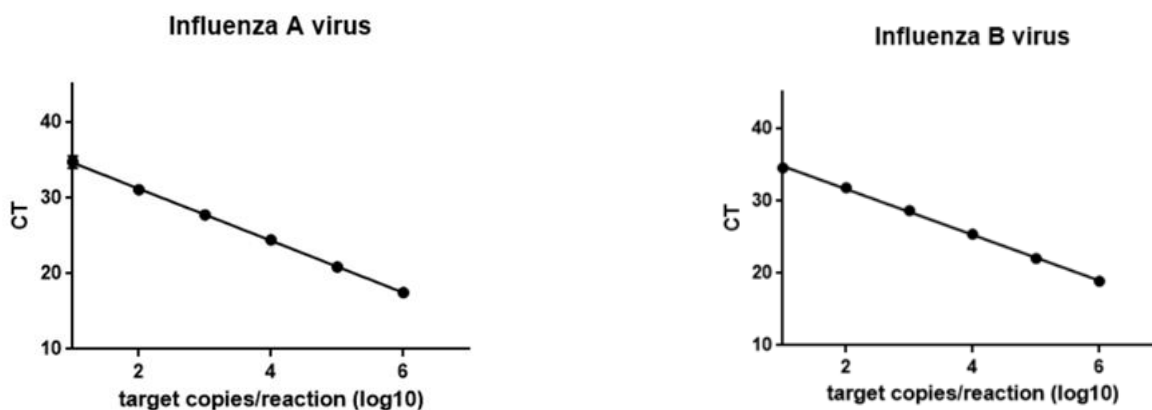
**Methode:** Die Nachweisgrenze (LoD95% = kleinste Kopienzahl der Ziel-RNA, die in 95% der Fälle nachgewiesen werden kann) wurde mit Verdünnungen von zwei zertifizierte Referenz RNA Proben mit bekannten Konzentrationen von Influenza A Virus und Influenza B Virus ermittelt. Es wurden zwanzig Replikate mit vier verschiedenen Konzentrationen um die erwartete Nachweisgrenze getestet (20, 15, 10 und 5 Kopien/Reaktion). Die Berechnung erfolgte mit einer nichtlinearen (logistischen) Kurvenanpassung unter Verwendung der GraphPad Prism Software.

**Resultat:** Die LoD95% beträgt 5,7 Zielkopien/Reaktion für Influenza A Virus und 6 Zielkopien/Reaktion für Influenza B Virus.

### 13.3. Linearität und dynamischer Messbereich

**Methode:** Die Linearität von ViroReal® Kit Influenza A/B wurde mit 10-fach Verdünnungsreihen ( $10^6 - 10^1$  Zielkopien/Reaktion) von zwei synthetischen RNAs, die Teile der Influenza A Virus und Influenza B Virus RNA repräsentieren, getestet. Die Anzahl der Bestimmungen (n) pro Verdünnung betrug vier.

**Resultat:** Der Test zeigt für Influenza A Virus zwischen 10 - 1.000.000 Zielkopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von  $-3,434 \pm 0,03884$  und einem  $R^2$  von 0,99 und für Influenza B Virus zwischen 10 - 1.000.000 Zielkopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von  $-3,166 \pm 0,02417$  und einem  $R^2$  von 0,99 (Abbildung 2).



**Abbildung 2** 10-fache Verdünnungsreihe einer synthetischen Influenza A Virus und Influenza B Virus RNA aufgetragen gegen den CT

### 13.4. Präzision

**Methode:** Die Präzision innerhalb eines Laufs (Intra-Assay), zwischen mehreren Läufen (Inter-Assay) und zwischen zwei Lots (Inter-Lot) wurde bestimmt.

**Resultat:** Der Variationskoeffizient (CV%) liegt für Influenza A Virus für die Intra-Assay Präzision im Mittel bei 0,8%, für die Inter-Assay Präzision bei 1,9% und für die Inter-Lot Präzision bei 0,9%. Der Variationskoeffizient (CV%) liegt für Influenza B Virus für die Intra-Assay Präzision im Mittel bei 0,4%, für die Inter-Assay Präzision bei 0,7% und für die Inter-Lot Präzision bei 0,3%.

### 13.5. Analytische Spezifität

**Methode BLAST Analyse:** Analytische Spezifität wird durch die Selektion hochspezifischer Primer und Sonden gewährleistet. Die Spezifität der Primer und Sonden wurde *in silico* validiert, indem das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) gegen die NCBI-Datenbank durchgeführt wurde. Primer und Sonden wurden

auf potenzielle Homologien zu derzeit publizierten Sequenzen kontrolliert. Diese Analyse validiert den Nachweis derzeit bekannter Influenza A Virus und Influenza B Virus Stämme.

**Resultat:** Für das Matrixprotein-Gen des Influenza A Virus wurde eine hochkonservierte Region in bekannten Influenza A Virusstämmen als Zielregion gewählt. Das Matrixprotein ist eines der sich am langsamsten entwickelnden Proteine, die vom Genom des Influenzavirus kodiert werden. Aufgrund der Sequenzheterogenität innerhalb der Zielregion einiger Subtypen des Influenza A Virus, vor allem derjenigen, die Katzen, Vögel und Schweine infizieren, kann es zu falsch-negativen oder weniger sensitiven Ergebnissen kommen.

Für das Hämagglutinin-Protein-Gen des Influenza B Virus wurde eine hochkonservierte Region in bekannten Influenza B Virusstämmen als Zielregion gewählt. BLAST-Analysen ergaben keine relevanten Mismatches in den Primer- und Sondenbindungsstellen der bisher bekannten Stämme.

**Methode Testung Inklusivität:** Es wurde RNA von definierten Influenza A Virus Isolaten (n=6) und Influenza B Virus Isolaten (n=8) getestet.

**Resultat:** Alle Isolate wurden positiv getestet.

**Methode Testung Exklusivität:** Die analytische Spezifität wurde weiters mit genomischer DNA oder RNA von Viren (Enterovirus D68, Adenovirus, RSV A, MPV A, Rhinovirus A, MERS CoV, HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV OC43, SARS 2003, SARS-CoV-2) getestet.

**Resultat:** Es wurden keine Kreuzreaktionen beobachtet.

### 13.6. Diagnostische Evaluierung

#### Methode:

Für die diagnostische Evaluierung von Influenza A wurden 24 bekannte Influenza A-Isolate sowie 6 Influenza A-positive nasopharyngeale Abstriche mit einem Assay Mix, der Primer und Sonde für das Matrix Protein Gens des Influenza A Virus enthält (Singleplex Detektion), untersucht. In allen Proben konnte Influenza A-spezifische RNA nachgewiesen werden. In 13 Influenza A-negativen Proben konnte kein Influenza A nachgewiesen werden. Es gab keine Kreuzreaktionen mit 10 Isolaten von Influenza B (Tabelle 3, 4).

**Tabelle 3** Resultate der diagnostischen Evaluierung

	Referenz			Total
		pos	neg	
Influenza A Assay Mix	pos	30	0	30
	neg	0	23	23
	Total	30	23	53

**Tabelle 4** Zusammenfassung der diagnostischen Evaluierung für Influenza A

	Wert	95% CI
Sensitivität	100%	88,43% bis 100%
Spezifität	100%	85,18% bis 100%
NPV	100%	85,18% bis 100%
PPV	100%	88,43% bis 100%
Prevalenz	64%	

Für die diagnostische Evaluierung von Influenza B wurden 9 Influenza B-Isolate, 4 Influenza B-positive nasopharyngeale Abstriche, sowie 13 Influenza B-negative nasopharyngeale Abstriche mit einem Assay Mix, der Primer und Sonde für das Hämagglutinin Protein Gen des Influenza B Virus enthält (Singleplex Detektion), untersucht. Alle Proben wurden korrekt analysiert (Tabelle 5, 6).

**Tabelle 5** Resultate der diagnostischen Evaluierung

	Reference			Total
		pos	neg	
Influenza B Assay Mix	pos	13	0	13
	neg	0	30	30
Total		13	30	43

**Tabelle 6** Zusammenfassung der diagnostischen Evaluierung

	Wert	95% CI
Sensitivität	100%	75,29% bis 100.00%
Spezifität	100%	88,43% bis 100.00%
NPV	100%	88,43% bis 100.00%
PPV	100%	75,29% bis 100.00%
Prevalenz	30%	

## 14. Literatur

Taubenberger JK and Morens DM. 2008. The pathology of influenza virus infections. Annu. Rev. Pathol. 3: 499-522.

## 15. Änderungsindex

Änderung	Datum	Beschreibung
1.0	25.05.2022	Erstversion
1.1	01.05.2023	<p><b>Änderung der Firmenadresse</b></p> <p><b>5. Inhalt, Stabilität und Lagerung</b> Kitversion 1.1: Geändertes Füllvolumen von IPC Target (RNA) Das RNA IPC Target wird nicht mehr in RNA/DNA Stabilizer aufbewahrt, die Konzentration wurde von ca. <math>6 \times 10^5</math> Kopien/<math>\mu</math>l zu ca. <math>6 \times 10^4</math> Kopien/<math>\mu</math>l geändert und es wurde zu IPC-Target (RNA) umbenannt.</p> <p><b>7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise</b> Update dieser Sektion. Aufnahme zusätzlicher Informationen zur Probenentnahme und -lagerung, zur Verarbeitung der Proben nach der Entnahme, zu den Lagerbedingungen der Proben, zu den Transport- und Lagerbedingungen der gereinigten RNA. Empfohlene Maßnahmen zur Vermeidung von RNA-Kontaminationen eingefügt.</p> <p><b>9. Probenvorbereitung</b> Update von Absatz über Qualitätskontrolle für DNA-Extraktion und PCR-Inhibition Hinweis, dass das IPC Target (RNA) bei Cq Werten &lt;27 vor der Extraktion verdünnt werden muss.</p> <p><b>10. Vorbereitung der real-time PCR</b> Verdünnung des IPC-Target (RNA) wurde von 1:500 auf 1:100 geändert</p> <p><b>11. Auswertung der PCR-Daten</b> Tabelle 1 und Tabelle 2: Update</p>

### Hinweis:

Alle im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetretenen schwerwiegenden Vorfälle sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und / oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

### Technischer Support:

ingenetix GmbH, Haidingergasse 1, 1030 Wien, Österreich

**Telefon:** +43 (0)1 36 198 01; **E-Mail:** office@ingenetix.com