

DNA Technology A/S

FluAVision™

REF DNAT-IAV

Deutsch



FluAVision™

TEST AUF INFLUENZA A-VIRUS

Bedienungsanleitung
Katalognummer: DNAT-IAV
96 Tests pro Kit

INHALTSVERZEICHNIS

1. DER FLUAVISION-TEST
2. VERFAHRENSPRINZIP
3. BESTANDTEILE UND AUFBEWAHRUNG DES KITS
4. ZUSÄTZLICHE BETRIEBSMITTEL UND ERFORDERLICHE MATERIALIEN
5. VORSICHTSMASSNAHMEN
 - 5.1 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen
 - 5.2 Sicherheit
6. VERFAHREN
 - 6.1 Hinweise
 - 6.2 Vorbereitung der Probe und Reinigung der RNA
 - 6.3 RT-PCR
 - 6.4 Hybridisierung und Nachweis
7. AUSWERTUNG
8. LITERATURANGABEN

1. DER FluAVision TEST

FluAVision™ ist ein für den Nachweis des Influenza A-Virus entwickeltes Testkit. Der Test beruht auf einem Amplifikationsverfahren unter Verwendung einer One-Tube Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, (engl. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, abgek. RT-PCR), gefolgt von einer Nukleinsäure-Hybridisierung und dem Nachweis anhand der Farbentwicklung in mit einer Influenza A-Virus-spezifischen Sonde beschichteten Mikrotitervertiefungen.

Das Influenza A-Virus ist weltweit eine der Hauptursachen für Krankheit und Sterblichkeit. Da es sich um eine akute Atemwegsinfektion handelt, ist eine schnelle Diagnostik wichtig. Das Influenza A-Virus befällt Menschen, bestimmte Säugetierspezies wie Schweine und Pferde sowie Vogelarten (Murphy and Webster, 1996). Serologisch werden die Influenza-Virus-Oberflächenantigene Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in Untertypen eingeteilt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind 15 HA- und 9 NA-Subtypen bekannt (Röhm et al., 1996, Webster et al., 1992). Die Zoonosen in jüngerer Zeit, beginnend 1997 in Hong Kong bis hin zur augenblicklichen Situation in Asien, haben gezeigt, dass Vogelgrippeviren auf den Menschen übertragbar sind (Claas et al., 1998, de Jong et al., 1997, Peiris et al., 1999, Capua and Alexander, 2004) und die Gefahr einer neuen Influenza-Pandemie nicht ausgeschlossen werden kann (Monto, 2005, Kaye and Pringle, 2005). Da das zirkulierende Influenza A-Virus in der Lage ist, sich durch genetische Abweichungen und Verschiebungen zu verändern, muss das Nachweisverfahren so beschaffen sein, dass seine Spezifität auch den Nachweis antigenetisch und genetisch abweichender Stämme des Influenza A-Virus erlaubt. Das FluAVision-Kit weist die unterschiedlichen HA-Subtypen des Influenza A-Virus (HA 1-15) nach und stellt eine schnelle, empfindliche und spezifische Alternative zum Nachweis des Influenza A-Virus durch Vermehrung in Eiern/Kulturen dar.

Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.

2. VERFAHRENSPRINZIP

Abbildung 1 zeigt ein Ablaufdiagramm der verschiedenen Arbeitsschritte bei Amplifikation und Nachweis des Influenza A-Virus mit dem FluAVision™-Kit.

Als Vorlage für die Synthese der cDNA mit dem Enzym Umkehrtranskriptase (engl. reverse transcriptase, abgek. RT) dient Virus-DNA. Die resultierende cDNA liefert eine Vorlage für die PCR¹-Amplifikation mit biotinylierten Primern. Dieses auch als RT-PCR bezeichnete Verfahren wird als One-Tube-Assay für die Amplifikation des Influenza A-Virus eingesetzt.

Der Nachweis der Amplikonen beruht auf der Hybridisierung einer wärmebeständigen, kovalent an die feste Kunststoff-Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebundenen und auf das Influenza A-Virus spezifischen Capture-Sonde. Nach der Hybridisierung an die Capture-Sonde wird eine Reaktion zwischen dem denaturierten Biotin-markierten PCR-Produkt und Streptavidin-konjugierter Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish Peroxidase, abgek. HRP) ausgelöst. Durch Zugabe eines Enzymsubstrats kann das Vorhandensein von Influenza A-Virus spektralfotometrisch anhand der Farbentwicklung nachgewiesen werden. Nach 10 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von Säure gestoppt. Die spezifische Hybridisierung der Amplikonen an die Sonde steigert die Gesamt-Spezifität der Reaktion.

¹ Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) ist durch Patente im Besitz von Hoffmann-LaRoche geschützt. Für die Verwendung der PCR ist eine Lizenz erforderlich.

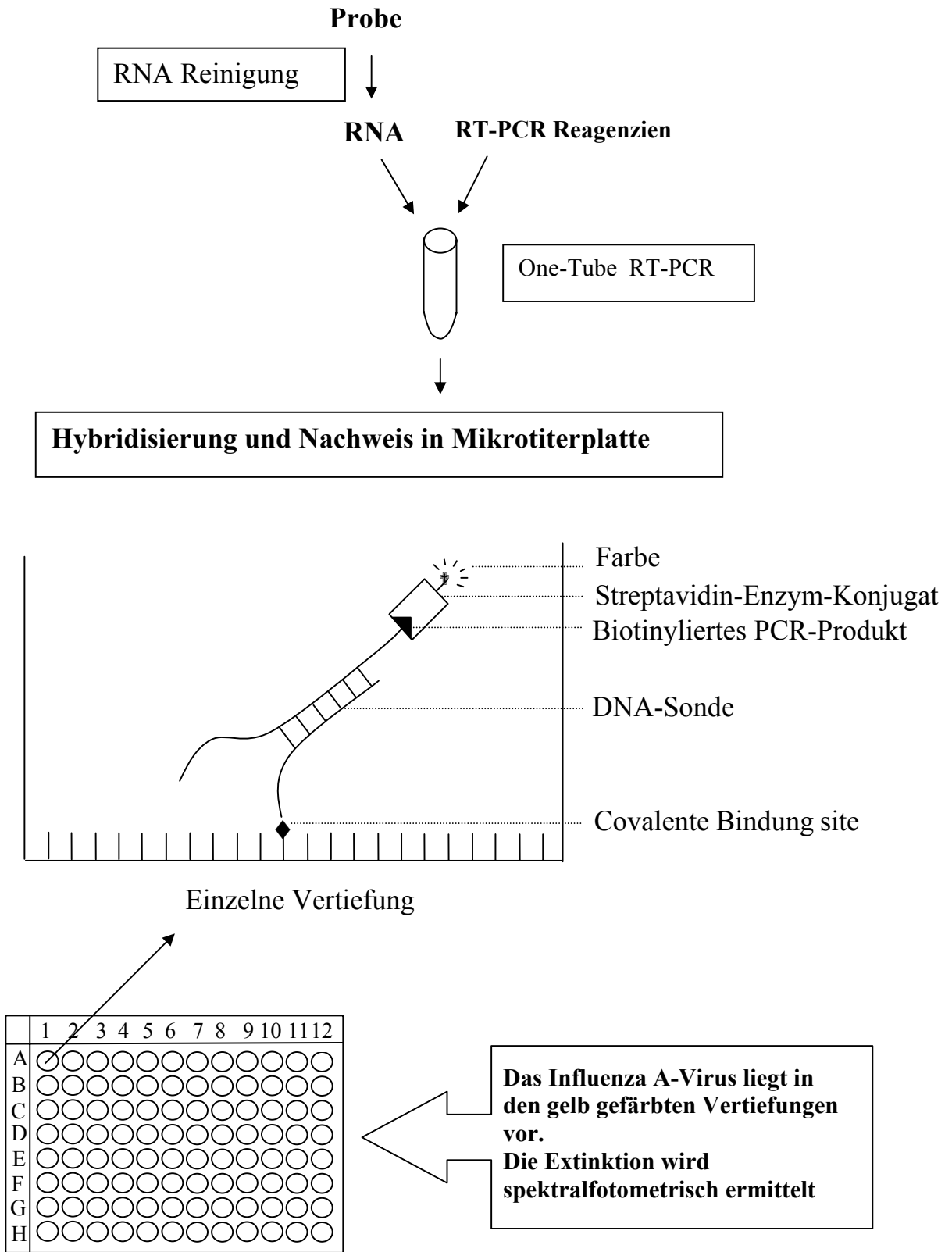


Abbildung 1 Ablaufdiagramm der verschiedenen Arbeitsschritte bei der Amplifikation und dem Nachweis des Influenza A-Virus mit dem FluAVision™-Kit.

3. BESTANDTEILE UND AUFBEWAHRUNG DES KITS

IM KARTON GELIEFERTE MATERIALIEN:

12 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen,
beschichtet mit Influenza A-Virus Capture-Sonde.
FluAVision Denaturierungslösung. 7,5 ml
FluAVision Hybridisierungspuffer. 15 ml
FluAVision Streptavidinpuffer. 15 ml
FluAVision Waschpuffer, 10fach konzentriert. 100 ml
FluAVision Stopplösung. 15 ml
FluAVision Substrat A. 12 ml

FluAVision Substrat B (schädlich, enthält Tetramethyl-
benzidin und Dimethylformamid). 5 ml
FluAVision Streptavidin 40fach konzentriert. 350 µl
Bedienungsanleitung
1 Mikrotiterrahmen
3 Abdeckfolien für Mikrotitervertiefungen

AUF TROCKENEIS GELIEFERTE MATERIALIEN:

FluAVision Puffergemisch 3 x 1,2 ml
FluAVision Primergemisch 35 µl
RT-Gemisch 35 µl
10 mM dNTP 3 x 120 µl
Positivkontrolle (in vitro transkribierte RNA) 6 x 10 µl

AUFBEWAHRUNG DER REAGENZIEN:

FluAVision Puffergemisch, FluAVision Primergemisch, RT-Gemisch und dNTP müssen im Prä-Amplifikationsbereich 2 bei -20 °C aufbewahrt werden (weitere Angaben siehe 5.1). Die Positivkontrolle für das Influenza A-Virus muss bei -20 °C im Prä-Amplifikationsbereich 1 aufbewahrt werden. Mikrotiterstreifen, Streptavidin, Streptavidinpuffer, Denaturierungslösung, Hybridisierungspuffer und Waschlösung müssen bei 4 °C aufbewahrt werden (diese Reagenzien nicht einfrieren). Substrat A und Substrat B müssen bei 4 °C vor Licht geschützt aufbewahrt werden.

AUF DEN PRÜFRÖHRCHEN/FLASCHEN VERWENDETE SYMBOLE:

IAV, STREIFEN MIT 8 VERTIEFUNGEN
DENATURIERUNG
HYBRIDISIERUNG
STREPTAVIDIN
WASCHPUFFER 10x
STOP
SUBSTRAT A

SUBSTRAT B

Streptavidin 40x

KEINES

KEINES

KEINES

AUF DEN PRÜFRÖHRCHEN- /FLASCHEN VERWENDETE SYMBOLE:

Puffergemisch








Primergemisch

RT-Gemisch

10 mM dNTP

Pos. Kontrolle

SONSTIGE AUF DEN PRÜFRÖHRCHEN UND FLASCHEN VERWENDETE SYMBOLE:

	Hersteller		In Vitro Diagnostikum		Schlagen Sie in der Gebrauchsanweisung nach
	Losnummer		Lagertemperatur		Inhaltsstoffe
	Verfallsdatum	REF	Katalognummer		

4. ZUSÄTZLICHE BETRIEBSMITTEL UND ERFORDERLICHE MATERIALIEN

Pipetten
Transferpipetten
Mikropipettenspitzen mit Aerosolsperre
Mikrozentrifuge
Qiagen-Säulen zur Reinigung der Virus- RNA (dringend empfohlen)
Dünnwandige PCR-Röhrchen à 0,2 ml
HotStarTaq-Enzym und HotStar PCR-Puffer 10fach
Negative Kontrollprobe
Negativkontrolle (H₂O)
Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9700 (oder vergleichbarer Thermocycler)
ELISA Lesegerät

5. VORSICHTSMASSNAHMEN

5.1 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Ausschlaggebend für die Ergebnisse sind Qualität und Konzentration der Proben-RNA. Beim Umgang mit RNA immer Schutzhandschuhe tragen, da es über die Hände am ehesten zu einer Ribonuklease-Kontamination kommt.

Aufgrund der hohen Sensitivität des DNA-Amplifikationsverfahrens können die Reaktionen bei einer unbeabsichtigten Kontaminierung durch Produkte der Amplifikationsreaktionen selbst falsch-positive Ergebnisse zeigen.

Labors, die diese Verfahren durchführen, sollten hierfür getrennte, fest zugeordnete Bereiche oder Räume vorsehen.

Ein separater Prä-Amplifikationsbereich sollte für die RNA-Reinigung und die Zugabe der Vorlage zum RT-PCR bestimmt sein (Prä-Amplifikationsbereich 1).

Ein weiterer Prä-Amplifikationsbereich sollte für das Ansetzen der PCR-Reagenzien und den Aufbau bestimmt sein (Prä-Amplifikationsbereich 2).

Der Bereich für den Nachweis der Amplifikation sollte einen separaten Bereich enthalten, in dem die Amplikonen vom RT-PCR-Teströhrchen in die Mikrotitervertiefung überführt werden.

Im Prä-Amplifikationsbereich 2 sollte ein Gefriergerät für die Aufbewahrung der PCR-Reagenzien vorhanden sein. In diesem Bereich sollten ein Satz Mikropipetten, Pipettenspitzen mit Aerosolsperre, Einweg-Handschuhe und Laborkittel aufbewahrt werden.

Der Arbeitsablauf muss so organisiert werden, dass Personen, die im Amplifikations-Nachweislabor verwendete Amplikonen oder sonstige Reagenzien handhaben, niemals den Prä-Amplifikationsbereich betreten, ohne zuerst alle im Amplifikations-Nachweislabor verwendeten Handschuhe, Laborkittel und sonstigen Gegenstände abzulegen. Geräte, Betriebsmittel, Laborkittel, Handschuhe und Reagenzien, die im Amplifikations-Nachweislabor zum Einsatz gekommen sind, dürfen niemals in den Prä-Amplifikationsbereich gebracht werden.

Sowohl im Prä-Amplifikationsbereich als auch im Amplifikations-Nachweislabor müssen Labortische und Pipetten regelmäßig mit Bleichmittel gereinigt werden.

Während des gesamten Verfahrens wird die Verwendung von Pipettenspitzen mit Aerosolsperre dringend empfohlen. Laborkittel und Handschuhe, die im Amplifikations-Nachweislabor getragen wurden, müssen sofort nach Abschluss des Verfahrens abgelegt werden. Es ist unerlässlich, Handschuhe nach der Handhabung von Teströhrchen, die Amplifikationsprodukte enthalten, zu wechseln. Diese Röhrchen, die hohe Konzentrationen an Amplikonen enthalten, müssen mit höchster Achtsamkeit geöffnet werden, um Verschütten bzw. Aerosolisierung zu verhindern.

5.2 Sicherheit

- Angemessene Sicherheitsmaßnahmen müssen jederzeit beachtet werden.
- Bevor mit dem Test begonnen wird, die Anleitung durchlesen und Verständnisschwierigkeiten ausräumen.
- Jederzeit müssen normale aseptische Laborverfahren eingehalten werden.
- Alle Proben so handhaben, als könnten sie Krankheiten übertragen.
- Während aller Arbeitsschritte des Assays Einmalhandschuhe tragen.
- Die Substratlösung enthält Tetramethylbenzidin und Dimethylformamid, das bei Einatmen, Verschlucken oder Kontakt mit der Haut hochgiftig ist.
- Der Hybridisierungspuffer enthält einen chaotropischen Wirkstoff, bei dem es sich um ein Reizmittel handelt.
- Der Denaturierungspuffer enthält 1,6 % NaOH.
- Die Stopplösung enthält 1 M H₂SO₄.

6. VERFAHREN

6.1 Hinweise

- Alle Komponenten des Tests wie in Abschnitt 3 angegeben aufbewahren.
- Bei jedem Durchgang mit Patientenproben sollte mindestens eine Negativkontrolle (Wasser) und/oder eine Negativkontrollprobe mitlaufen.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen nicht mischen.
- Sorgfalt bei den Pipettierverfahren ist ausschlaggebend für korrekte Ergebnisse.
- Das Protokoll wurde mit den Säulen zur Reinigung der Virus-DNA (Qiagen) validiert, die dringend empfohlen werden. Andere Reinigungsverfahren sind nicht validiert und müssen vom Anwender selbst optimiert werden.
- Dieses Protokoll wurde für den Perkin-Elmer GeneAmp 9700 Thermocycler optimiert. Die Verwendung eines anderen Thermocyclers muss möglicherweise vom Anwender selbst optimiert werden.
- Dieses Protokoll wurde für die Verwendung von HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) optimiert. Bei Verwendung von DNA-Polymerasen anderer Hersteller können optimale Ergebnisse nicht gewährleistet werden; diese müssen vom Anwender selbst optimiert werden.

6.2 Vorbereitung der Probe und Reinigung der RNA

Bei klinischen Proben handelt es sich typischerweise um Tupfer.

Zur Entnahme von Proben im Tracheal- und Urogenitalbereich werden trockene sterile Tupfer verwendet. Die Tupfer werden in 1-2 ml steriles Transportmedium, dem Antibiotika zugesetzt wurden, gestellt. Ist keine sofortige Isolierung des Influenza A-Virus möglich, können die Proben bis zu 48 Stunden bei 4 °C oder für längere Zeiträume tiefgefroren bei -80 °C aufbewahrt werden.

Das Influenza A-Virus wird von den Tupfern gewonnen, indem die Proben 30 Min. bei langsamer Geschwindigkeit geschüttelt und anschließend 10 Min. in einer Kühlzentrifuge bei 1000 xg zentrifugiert werden. Der Überstand wird für die RNA-Reinigung verwendet.

Immer eine H₂O- und/oder Negativkontrollprobe mitlaufen lassen. Als Negativkontrolle eignet sich Material von einer Influenza-Virus-negativen Probe, das aus derselben Körperflüssigkeit stammt wie die zu untersuchende Probe.

Gegebenenfalls eine Positivkontrolle mitführen.

Der Positivkontrolle vor der Reinigung 130 µl ddH₂O (Aqua bidest) zusetzen.

Um eine Kreuzkontaminierung der Proben zu verhüten, muss die Positivkontrolle unbedingt mit äußerster Sorgfalt gehandhabt werden.

Die Proben, jeweils 140 µl, werden entsprechend den Anweisungen des Herstellers in den Qiagen-Säulen zur Reinigung der Virus-DNA gereinigt. Wird das Gemisch allerdings während des Reinigungsverfahrens in zwei Arbeitsschritten geladen, so wird empfohlen, Transferpipetten und ein separates Entnahmeröhrchen zu verwenden, um das Kontaminationsrisiko so gering wie möglich zu halten. NB! Das RT-PCR-Gemisch muss vor der Reinigung der Proben angesetzt werden; siehe unten.

6.3 RT-PCR

Ansetzen des RT-PCR-Gemischs

Um das Kontaminationsrisiko so gering wie möglich zu halten, muss das RT-PCR-Gemisch angesetzt werden, bevor die zu testenden, potenziell virushaltigen Proben gehandhabt werden.

Immer mindestens eine Wasserkontrolle mitlaufen lassen.

In einem fest zugeordneten Bereich das RT-PCR-Gemisch wie folgt ansetzen:

Für je 8 Reaktionen mischen:

FluAVision Puffergemisch:	290 µl
FluAVision Primergemisch	2 µl
dNTP:	24 µl
RT-Gemisch:	2 µl
HotStarTaq:	2 µl
<u>HotStarTaq PCR Puffer 10fach</u>	<u>40 µl</u>
Gesamt:	360 µl

FluAVision Puffergemisch, FluAVision Primergemisch, dNTP und RT-Gemisch sind im Kit enthalten. HotStarTaq Enzym und HotStar PCR Puffer 10fach sind erforderlich und über Qiagen erhältlich.

Durch Vortexen mischen, herunter zentrifugieren und 45 µl Gemisch in die entsprechend beschrifteten dünnwandigen PCR-Röhrchen transferieren. Das RT-PCR-Gemisch bis zum Gebrauch auf Eis aufbewahren.

RT-PCR

1. Dem entsprechend beschrifteten, 45 µl des RT-PCR-Gemischs enthaltenden PCR-Röhrchen 5 µl des Säuleneluats zugeben und Röhrchen verschließen.
2. Die Proben in den Amplifikationsbereich bringen und in den Thermocycler stellen. Das PCR-Cycling sofort mit folgendem Programm beginnen:

RT-PCR Programm:

30 Min. bei 42 °C

15 Min. bei 95 °C (zur Aktivierung von HotStarTaq)

30 Sek. bei 95 °C
30 Sek. bei 58 °C
30 Sek. bei 72 °C

} **40 Zyklen**

Bei 4 °C halten.

6.4 Hybridisierung und Nachweis:

Mit einer Influenza A-Virus-spezifischen Sonde beschichtete Mikrotiterplatten werden verwendet, um anzuzeigen, ob eine Probe auf Influenza A-Virus positiv oder negativ ist.

Die entsprechende Anzahl an Mikrotitervertiefungen und alle Reagenzien vor der Verwendung Raumtemperatur annehmen lassen. Pufferlösungen, die ein Präzipitat aufweisen, erwärmen (37 °C), bis dieses verschwindet.

- 1 Durch Zugabe von 1 Teil Waschlösung 10fach auf 9 Teile destilliertes Wasser pro Mikrotiterstreifen (8 Vertiefungen) etwa 30 ml Arbeitswaschlösung ansetzen und gut mischen.
- 2 Durch Zugabe von 25 µl Streptavidin zu 1 ml Streptavidinpuffer etwa 1 ml Streptavidin-Arbeitslösung pro Mikrotiterstreifen ansetzen und gut mischen.
- 3 Jedem der PCR-Reaktionsröhrchen 50 µl Denaturierungslösung zugeben. Zur Gewährleistung der vollständigen Denaturierung 10 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
- 4 Die entsprechende Anzahl Mikrotitervertiefungen in den Rahmen einsetzen. Die Vertiefungen müssen vorsichtig gehandhabt werden, um ein Durchbrechen zu vermeiden.
- 5 Jeder Vertiefung 100 µl Hybridisierungspuffer zusetzen.
- 6 Jeder Vertiefung 25 µl denaturiertes Amplifikationsprodukt zusetzen. Durch Pipettieren vorsichtig mischen, bis die Farbe sich von hellbraun zu blau verändert.
- 7 Vertiefungen abdecken und 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.
- 8 Vertiefungen 5-mal mit der Arbeitswaschlösung ausspülen. Nach jedem Reagenzienentfernungs- und Waschschrift mit einem Papiertuch trocken tupfen.
- 9 Jeder Vertiefung 100 µl Streptavidin-Arbeitslösung zusetzen.
- 10 Vertiefungen abdecken und 15 Min. bei 37 °C inkubieren.
- 11 Vertiefungen 5-mal mit der Arbeitswaschlösung ausspülen.
- 12 Durch Mischen von 750 µl Substrat A und 250 µl Substrat B etwa 1 ml/ Mikrotiterstreifen Substrat-Arbeitslösung ansetzen. Vor direkter Lichteinwirkung schützen.
- 13 Jeder Vertiefung 100 µl Substrat-Arbeitslösung zusetzen.
- 14 Die Farbe etwa 10 Min. entwickeln lassen, dabei vor Licht schützen.
- 15 Jeder Vertiefung 100 µl Stopplösung zusetzen.
- 16 Die optische Dichte (OD) bei 450 nm und einer Bezugswellenlänge von 620 nm messen. Beachten, dass die OD-Werte um etwa + 0,1 OD höher liegen, wenn ohne Bezugswellenlänge nur bei 450 nm abgelesen wird.

7. AUSWERTUNG

Das Vorhandensein von Influenza A-Virus in einer Testprobe wird durch Vergleich der OD der unbekannt Probe mit dem Cutoff-Wert ermittelt. Für diesen Assay wurde ein Cutoff-Wert von 0,5 gewählt. Eine Testprobe, deren Extinktion bei 450 nm und einer Bezugswellenlänge von 620 nm mindestens 0,5 beträgt, gilt als positiv auf die RNA des Influenza A-Virus. Eine Probe, deren Extinktion unter 0,5 liegt, sollte als vermutlich negativ auf die RNA des Influenza A-Virus angesehen werden. Die Extinktion der Wasser- und/oder Negativkontrollprobe darf höchstens 0,3 betragen.

Beachten, dass die Ermittlung einer OD bei 450 nm ohne Bezugswellenlänge den Wert um etwa + 0,1 OD erhöht, was entsprechend des festgelegten Cutoff-Werts sowie der Werte von Wasser- und/oder der Negativkontrollprobe berichtigt werden muss.

8. LITERATURANGABEN

Capua, I. and Alexander, D.J. (2004). Avian influenza: recent developments. *Avian pathology*. 33(4), pp. 393-404.

Claas, E.C., Osterhaus, A.D., van Beek, R., De Jong, J.C., Rimmelzwaan, G.F., Senne, D.A., Krauss, S., Shortridge, K.F., Webster, R.G. (1998). Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351, pp. 472-477.

de Jong, J.C., Claas, E.C., Osterhaus, A.D., Webster, R.G., Lim, W.L. (1997). A pandemic warning ? *Nature* 389, pp. 554.

Kaye, D. and Pringle, C.R. (2005). Avian Influenza viruses and their Implication for Human Health. *CID* 40, pp. 108-112.

Monto, A.S. (2005). The threat of an Avian Influenza Pandemic. *N. Engl. J. Med.* 352;4 pp. 323-325.

Murphy, B.R. and Webster, R.G (1996). Orthomyxoviruses. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds) *Field's Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 1397-1445.

Peiris, M., Yuen, K.Y., Leung, C.W., Chan, K.H., Ip, P.L., Lai, R.W., Orr, W.K., Shortridge, K.F. (1999). Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 354, pp. 916-917.

Röhm, C., Zhou, N., Suss, J., Mackenzie, J., Webster, R.G. (1996). Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: Criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 217: 508-516.

Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56: 209-217.