

CONGEN

SureFast® Hepatitis A PLUS

Art. No. F7125
100 rxn

User Manual



February 2026

 Inhalt

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweisgrenze	3
1.3	RNA-Präparation	4
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	4
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	4
1.6	Vorsichtsmaßnahmen	4
1.7	Geräteeinstellungen	5
1.8	Detektionskanaleinstellungen	5
2	Qualitative Analyse	6
2.1	Protokoll	6
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	6
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	7
2.2	Interpretation der Ergebnisse	7
3	Grenzen der Methode	8
4	Weitere Informationen	8
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	8
4.2	Technischer Support	8



Content

1	General Information	9
1.1	Description	9
1.2	Limit of Detection	9
1.3	RNA Preparation	10
1.4	Kit components and storage	10
1.5	Additionally required equipment and materials	10
1.6	Precautions for users	10
1.7	Setup.....	11
1.8	Detection channel Set-up	11
2	Qualitative Analysis	12
2.1	Protocol	12
2.1.1	Preparation of the master-mix	12
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	13
2.2	Interpretation of results	13
3	Limitations of the method	14
4	Further Information	14
4.1	Product Information	14
4.2	Technical Support	14

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFast® Hepatitis A PLUS ist eine real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis einer spezifischen RNA-Sequenz von Hepatitis A in Lebensmitteln und Wasser.

Der Test enthält eine externe Internal Control RNA (ICR, bestehend aus MS2-Bakteriophagen) die gleichzeitig als interne Amplifikationskontrolle und Extraktionskontrolle verwendet werden kann.

Bei Anwesenheit von inhibitorischen Substanzen in der RNA wird das Signal der Amplifikationskontrolle gestört oder die Amplifikation unterdrückt. Einige Beispiele für PCR-inhibitorische Substanzen sind Alkohole (z.B. Ethanol, Isopropanol), Tenside (z.B. CTAB, SDS, Triton X100) und Salze (z.B. Natriumchlorid). Des Weiteren können Gewürze, Kräuter, Algen, Kakao und andere Probenmatrizes inhibierend wirken.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM und VIC/HEX detektieren können, verwendet werden. Die interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, Bio Molecular Systems MIC, Agilent AriaDx und Agilent Mx3005P.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Hepatitis A PLUS real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 25 RNA-Kopien.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, RNA-Präparation und RNA-Gehalt.

Die SureFast® PCR Systeme sind sehr sensitiv. Demzufolge sind bereits sehr geringe Ziel-RNA Gehalte für eine Analyse ausreichend. Über die Bestimmung der Gesamt-RNA in der Probe werden keine Informationen über die Menge und die Qualität an Ziel-RNA erhalten.

1.3 RNA-Präparation

Für die RNA-Präparation wird der SureFast® PREP DNA/RNA Virus (Art. Nr. F1051) empfohlen.

Dieser Test enthält eine Internal Control RNA (ICR), die entweder nur als interne Amplifikationskontrolle oder als positive Extraktionskontrolle für die Probenpräparation mit gleichzeitiger Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

Wird die ICR nur als interne Amplifikationskontrolle verwendet, muss 1 µl pro Reaktion der ICR dem Master-Mix hinzugefügt werden (siehe Punkt 2.1.1).

Wird die ICR als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation mit gleichzeitiger Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der ICR während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICR wird vor der Lyse zu der schon mit Lysis Buffer versetzten Probe gegeben und sollte nicht direkt auf das Probenmaterial pipettiert werden.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 700 µl	Gelb
2	PP-Mix	1 x 770 µl	Hellgrün
3	Enzyme Mix	1 x 80 µl	Rot
R	Internal Control RNA	2 x 1700 µl	Braun
N	PCR Water	1 x 450 µl	Weiß
P	Positive Control	1 x 90 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -28 bis -16°C zu lagern.

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- RNA-Extraktionskit (z.B. SureFast® PREP DNA/RNA Virus Art. Nr. F1051)
- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen (510 nm und 580 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Vorsichtsmaßnahmen

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Proben müssen als potenziell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potenziell 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.

1.7 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & Rotor-Gene Q & R-Biopharm RIDA®CYCLER	LightCycler® 480 II
Reverse Transcription	10 min, 58°C	10 min, 58°C
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.8 Detektionskanaleinstellungen

Für zusätzliche Informationen wird auf die jeweilige Cycler-Bedienungsanleitung verwiesen.

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	Hepatitis A	FAM	+	
	ICR	HEX	+	
Agilent AriaDx /Mx	Hepatitis A	FAM	+	
	ICR	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	Hepatitis A	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	ICR	VIC	None	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	Hepatitis A	FAM	+	Baseline Einstellungen: • Baseline subtracted curve fit • Apply fluorescence drift correction
	ICR	VIC/HEX	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER / Bio Molecular Systems MIC	Hepatitis A	green	+	Ignore cycles before , wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Siehe Seite 47 Bedienungs- anleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse.
	ICR	yellow	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	Hepatitis A	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein.
	ICR	yellow	+	
Roche LightCycler® 480 II	Hepatitis A	465-510	+	
	ICR	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Hepatitis A	465-510	+	
	ICR	540-580	+	

2 Qualitative Analyse

2.1 Protokoll

2.1.1 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen.

Folgende Kontrollen werden empfohlen: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und Positive Control.

Dieser Test enthält eine externe Internal Control RNA (ICR), die als Inhibitions – bzw. als Extraktionskontrolle eingesetzt werden kann.

Wir empfehlen je 1 µl der ICR zum Master-Mix der Negativkontrolle und der Positive Control zu pipettieren.¹

Benötigte Reaktionen für den qualitativen Hepatitis A-Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen* (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-RNA

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen und zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen bei Verwendung der ICR als Extraktions- und Inhibitionskontrolle:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
Reaction Mix	12,5 µl	137,5 µl
PP Mix	6,9 µl	75,9 µl
Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
Gesamtvolumen	20,1 µl	221,1 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen bei Verwendung der ICR als interne Inhibitionskontrolle:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
Reaction Mix	12,5 µl	137,5 µl
PP Mix	6,9 µl	75,9 µl
ICR	1,0 µl	11,0 µl
Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
Gesamtvolumen	21,1 µl	232,1 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

*** Beschreibung der einzelnen Kontrollen**

- Negativkontrolle: besteht aus dem Master-Mix und 5 µl PCR Water (Kit Code N)¹
- Extraktionskontrolle: die Extraktion wird ohne Probe durchgeführt – Komponenten aus verwendeten Prep Kit
- Positive Control: Master-Mix und die im Kit beigelegte Positive Control¹

2.1.2 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Für die Negativkontrolle pipettieren von 5 µl des PCR Water in die vorgesehenen Reaktionsgefäße.¹
- Pipettieren von 5 µl der Proben-RNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße und verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäße und verschließen der Gefäße.¹
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Kontrollreaktionen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Im FAM-Kanal wird der Parameter Hepatitis A detektiert. Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle bzw. positive Extraktionskontrolle (ICR) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den Parameter Hepatitis A bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle (IAC) führen.

Ein Cp-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positiv Control zu erhalten.

Eine Probe wird als **negativ** für den Parameter Hepatitis A bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle bzw. positive Extraktionskontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** ist.

Sollte die Proben-RNA im VIC/HEX-Kanal keine Amplifikation oder keinen sigmoidalen Kurvenverlauf zeigen, weist dies auf das mögliche Vorhandensein von PCR Inhibitoren in der Probe hin. In diesem Fall muss die Isolierung und Reinigung der RNA aus der entsprechenden Probe verbessert werden. Es wird empfohlen den Extraktionsprozess zu wiederholen. Alternativ kann die RNA verdünnt (Empfehlung 1:2 in PCR-Wasser) und wiederholt auf Inhibition getestet werden. Beachten Sie bitte, dass sich die Nachweisgrenze für die Probe im spezifischen Nachweissystem mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Die folgende Tabelle zeigt die Spezifikationsbereiche der Kit Kontrollen

	Spezifikationsbereich	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)
Negativkontrolle	negativ	$25 \leq Cp \leq 34$
Positive Control (FAM – Hepatitis A)	$25 \leq Cp \leq 33$	nicht relevant

3 Grenzen der Methode

- Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
- Äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, können zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen.
- Bei stark prozessierten Proben kann es zu einer Verschiebung der Nachweisgrenze kommen. Faktoren wie hohe Drücke, mechanischen Belastungen, chemische Behandlung, extreme Temperaturen und/oder extreme pH-Werte während des Verarbeitungsprozesses – wie z.B. bei der Konservenherstellung – können Nukleinsäuren beschädigen oder abbauen. Das bedeutet, dass die Empfindlichkeit des Testkits verringert sein kann und möglicherweise nicht alle ursprünglichen Bestandteile erfasst werden.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Es deutet darauf hin, dass die Ziel RNA (Hepatitis A RNA) vorhanden ist.

4 Weitere Informationen

4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/download)
- Produktbegleitende Unterlagen (Download: www.congen.de/eifu/)
- Validierungsreport auf Anfrage

4.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden Sie sich bitte per E-Mail an info@congen.de.

1 General Information

1.1 Description

The SureFast® Hepatitis A PLUS is a real-time RT-PCR for the direct, qualitative detection of a specific RNA sequence of hepatitis A in food and water.

The test assay contains an external Internal Control RNA (ICR, consisting of MS2-bacteriophage) as an internal control of sample preparation procedure and to determine possible PCR inhibition.

If the RNA contains PCR inhibiting substances, the signal of the amplification control will be affected or the amplification will be suppressed. Examples for PCR inhibiting substances are alcohols (e.g. ethanol, isopropanol), surfactants (e.g. CTAB, SDS, Triton X100) and salts (e.g. sodium chloride). In addition spices, herbs, algae, cocoa and further sample matrices might have PCR inhibiting effects.

The real-time RT-PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at the channels FAM and VIC/HEX at the same time. The internal technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, Bio Molecular Systems MIC, Agilent AriaDx and Agilent Mx3005P.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® Hepatitis A PLUS real-time RT-PCR has a limit of detection of ≤ 25 RNA copies.

The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, RNA preparation and RNA content.

The SureFast® PCR systems are very sensitive and therefore even a small amount of target RNA is sufficient for a successful analysis. The concentration of total RNA in the sample does not allow a conclusion on the quantity and quality of the target RNA.

1.3 RNA Preparation

For RNA-preparation the use of SureFast® PREP DNA/RNA Virus (Art. No. F1051) is recommended.

The test assay contains an Internal Control RNA (ICR), which can either be used as PCR inhibition control or as positive extraction control for the sample preparation procedure and as a PCR inhibition control.

If the ICR is used only as a PCR inhibition control, 1 µl per reaction of the ICR should be added to the master-mix (see point 2.1.1).

If the ICR is used as an extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, 20 µl of the ICR should be added during extraction procedure. The ICR should always be pipetted to the sample with added Lysis Buffer and must not be added directly to the raw sample.

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 700 µl	Yellow
2	PP-Mix	1 x 770 µl	Light Green
3	Enzyme Mix	1 x 80 µl	Red
R	Internal Control RNA	2 x 1700 µl	Brown
N	PCR Water	1 x 450 µl	White
P	Positive Control	1 x 90 µl	Light Blue

Store all reagents at -28 to -16°C and protected from light.

1.5 Additionally required equipment and materials

- RNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP DNA/RNA Virus Art. No. F1051)
- real- time PCR instrument with two detection channels (510 nm and 580 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.6 Precautions for users

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- This test must only be performed by laboratory personnel trained in molecular biology methods.
- Strictly follow the working instructions.
- When handling samples, wear disposable gloves. After finishing the test, wash your hands.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or test reagents are being used.
- Food samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled and disposed according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.
- All reagents and materials used must be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulation for disposal.

1.7 Setup

	Blockcycler & Rotor-Gene Q & R-Biopharm RIDA®CYCLER	LightCycler® 480 II
Reverse Transcription	10 min, 58°C	10 min, 58°C
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.8 Detection channel Set-up

For additional details see cycler operating instructions for real-time PCR device.

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	Hepatitis A	FAM	+	
	ICR	HEX	+	
Agilent AriaDx /Mx	Hepatitis A	FAM	+	
	ICR	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	Hepatitis A	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	ICR	VIC	None	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	Hepatitis A	FAM	+	Baseline Settings: - Baseline subtracted curve fit - Apply fluorescence drift correction
	ICR	VIC/HEX	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER / Bio Molecular Systems MIC	Hepatitis A	green	+	Ignore cycles before , if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see page 45 of the cycler operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter.
	ICR	yellow	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Hepatitis A	green	+	Note: Please use only 0.1 ml reaction tubes. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	ICR	yellow	+	
Roche LightCycler® 480 II	Hepatitis A	465-510	+	
	ICR	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Hepatitis A	465-510	+	
	ICR	540-580	+	

2 Qualitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions) for the specific PCR assay.

Recommended control reactions for the specific PCR assay: negative control, extraction control and Positive Control.

The test assay contains an Internal Control RNA (ICR), which can either be used as PCR inhibition control or as positive extraction control.

If the ICR used as an extraction control, we recommend to add 1 µl of the ICR to the negative control and Positive Control master-mix.¹

Reactions needed for the qualitative hepatitis A detection:

3 reactions for controls* (1x negative control, 1x extraction control, 1x Positive Control)

For each sample: at least 1 reaction for each sample RNA

It is also recommended to prepare the master-mix with 10 % additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix and centrifuge before opening and use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10 % excess)
Reaction Mix	12.5 µl	137.5 µl
PP-Mix	6.9 µl	75.9 µl
Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
Total volume	20.1 µl	221.1 µl

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions for ICR only as PCR inhibition control:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10 % excess)
Reaction Mix	12.5 µl	137.5 µl
PP-Mix	6.9 µl	75.9 µl
ICR	1.0 µl	11.0 µl
Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
Total volume	21.1 µl	232.1 µl

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

* Description of the controls

- Negative control: master-mix and 5 µl PCR Water (Kit Code N)¹
- Extraction control: the extraction is performed without the sample – components from used Prep Kit
- Positive Control: master-mix and within the kit's provided Positive Control¹

2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- For the negative control pipette 5 µl PCR Water in the designated reaction tube and close them.¹
- Pipette 5 µl of sample RNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control into the designated tubes/wells and close them.¹
- Centrifuge all tubes/plates shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

2.2 Interpretation of results

The evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer.

The control reactions have to show the correct results.

Hepatitis A RNA is detected in the FAM-channel. In the VIC/HEX-channel the internal amplification or positive extraction control (ICR) is detected.

A sample is stated **positive** for hepatitis A, if the sample RNA shows amplification in the FAM-channel. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the internal amplification control (IAC).

A Cp value for the IAC is not needed to obtain a positive result of the Positive Control.

A sample is stated **negative** for hepatitis A, if the sample RNA shows no amplification in the FAM-channel and if the internal amplification or positive extraction control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive**.

If the sample RNA shows no amplification or sigmoidal amplification curve in the VIC/HEX channel, this indicates that inhibitors are present in the sample RNA that inhibit the PCR. Under these circumstances RNA isolation and purification of the sample need to be improved. It is recommended to repeat the extraction process. Alternatively, the RNA can be diluted (recommendation 1:2 in PCR-water) and analysed again for inhibition. Please note that the dilution factor also affects the detection limit of the specific PCR assay.

The following table shows the specification ranges of the kit controls.

	Specification range	Internal amplification control (IAC)
negative control	negative	$25 \leq C_p \leq 34$
Positive Control (FAM – Hepatitis A)	$25 \leq C_p \leq 33$	not relevant

3 Limitations of the method

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
- In highly processed samples, the limit of detection may be shifted. Factors such as high pressures, mechanical stresses, chemical treatment, extreme temperatures and/or extreme pH values during manufacturing process – such as in canning production – can damage or degrade nucleic acids. This means that the sensitivity of the test kit may be reduced and not all original components may be detected.
- A positive test result does not necessary indicate the presence of viable organism. It is indicative for the presence of the target RNA (hepatitis A RNA).

4 Further Information

4.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: www.congen.de/en/downloads)
- Product-related documents (Download: www.congen.de/en/eifu/)
- Validation Report upon request

4.2 Technical Support

For further questions please send an e-mail to info@congen.de.