

## SureFood® VIRUS Hepatitis A PLUS (100 Reakt.)

Art.-Nr. S7125

Version 1.0

### Beschreibung

Dieses Nachweisverfahren ist eine real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis vom Hepatitis A Virus. Der Test ist mit einer Extraktionskontrolle (Internal Control RNA) ausgestattet, die gleichzeitig auch als interne Amplifikationskontrolle verwendet werden kann. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm und 553 nm (FAM und VIC) detektieren können (Rotor-Gene Q, Stratagene MxSeries, Roche LightCycler® 480/2.0\*/1.5\* etc.), verwendet werden.

### Nachweisgrenze

Die SureFood® VIRUS Hepatitis A PLUS real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 50$  RNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von RNA-Präparation und RNA-Gehalt.

### RNA-Präparation

Für die RNA-Präparation wird das SureFood® PREP DNA/RNA Virus Kit empfohlen.

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

Wird die ICR nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1  $\mu$ l der ICR dem Master-Mix hinzugefügt werden.

Wird die ICR als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20  $\mu$ l der ICR während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICR soll dem Proben-Lysisbuffer Mix und nicht direkt dem Probenmaterial zugefügt werden.

### Kit-Inhalt und Lagerung

2x	Reaction Mix (700 $\mu$ l)	<b>(Code 1)</b>
1x	PP-Mix (770 $\mu$ l)	<b>(Code 2)</b>
1x	Enzyme Mix (80 $\mu$ l)	<b>(Code 3)</b>
2x	Internal Control RNA (1800 $\mu$ l)	<b>(Code R)</b>
1x	PCR Water (500 $\mu$ l)	<b>(Code N)</b>
1x	Positive Control (100 $\mu$ l)	<b>(Code P)</b>

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zu lagern.

### Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen 522 nm und 553 nm
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern

### Protokoll

1. Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Folgende Kontrollen werden empfohlen: Positivkontrolle, Negativkontrolle und Extraktionskontrolle. Dieser Test enthält eine Internal Control RNA (ICR), die als Extraktions- bzw. Inhibitionskontrolle eingesetzt werden kann.

\*Für Benutzer des Roche LightCycler® 2.0 und 1.5 ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes wird der SureCC Color Compensation Kit II (S4010) empfohlen.

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

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen bei Verwendung der Internal Control RNA 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
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,1 µl</b>	<b>221,1 µl</b>

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen bei Verwendung der Internal Control RNA 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
Internal Control RNA	1,0 µl	11,0 µl
Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>21,1 µl</b>	<b>232,1 µl</b>

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2. Geräteeinstellungen

<b>Blockcycler/Rotorcycler</b>	
RT-Reaktion	10 min, 58°C
Denaturierung	1 min, 95°C
Cycles	45
Denaturation	15 sec, 95°C
Annealing/Extension	30 sec, 55°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Nachweissystem: Diverse Geräte <b>FAM</b> -Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm Interne Amplifikationskontrolle: Diverse Geräte <b>VIC/HEX</b> -Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der Congen-Homepage zur Verfügung: <a href="http://www.congen.de/information/geraeteinstellungen-fuer-surefood-kits.html">http://www.congen.de/information/geraeteinstellungen-fuer-surefood-kits.html</a>	

3. Preparation of the PCR-mix
  - Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes or wells.
  - For the negative control pipette 5 µl of PCR Water into the designated tubes and close them.
  - Pipette 5 µl of sample RNA into the designated tubes and close them.
  - Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes and close them.
  - 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.

#### 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 need to give the correct results.

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

If the sample RNA and the internal amplification control are **negative** the sample contains PCR-inhibiting substances or the sample preparation was not successful. Under these circumstances an evaluation of the samples is not possible. RNA isolation and purification for the sample need to be improved.

#### Product Information

- Validation Report
- Material Safety Data Sheet
- Product Information

#### Technical Support

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to sales@r-biopharm.de.

#### Distribution and ordering

R-Biopharm AG  
An der neuen Bergstrasse 17,  
64297 Darmstadt, Germany  
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0  
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20  
E-Mail: orders@r-biopharm.de  
www.r-biopharm.com



3. Herstellen des 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. Verschließen der Gefäße.
  - Pipettieren von 5 µl der Proben-RNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
  - Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Reaktionsgefäße.
  - Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
  - Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und die PCR entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

#### Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Die spezifische RNA-Sequenz von Hepatitis A wird im FAM-Kanal nachgewiesen. Die interne Amplifikationskontrolle beziehungsweise die Extraktionskontrolle wird im VIC-Kanal nachgewiesen. Eine Probe wird **positiv** für Hepatitis A bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für Hepatitis A bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) **positiv** ist.

Eine Probe, die **negativ** für Hepatitis A und **negativ** im VIC/HEX-Kanal (Interne Amplifikationskontrolle bzw. Extraktionskontrolle) ist, kann nicht bewertet werden. In diesem Fall sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden oder die Nukleinsäure-Extraktion hat nicht ordnungsgemäß funktioniert. Die Isolierung und Reinigung der RNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

#### Weitere Informationen

- Validierungsdaten
- Material Safety Data Sheet
- Produktinformation

#### Technischer Support

Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@r-biopharm.de.

#### Vertrieb und Bestellung

R-Biopharm AG  
An der neuen Bergstrasse 17,  
64297 Darmstadt, Germany  
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0  
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20  
E-Mail: orders@r-biopharm.de  
www.r-biopharm.com



**Description**

The test is a real-time RT-PCR for the direct and qualitative detection of hepatitis A virus. The test contains an Internal Control RNA (ICR) as an internal control of sample preparation procedure and to determine possible PCR-inhibition. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at 522 nm and 553 nm (FAM and VIC) at the same time (Rotor-Gene Q, Stratagene MxSeries, Roche LightCycler® 480/2.0\*/1.5\* etc.).

**Limit of Detection**

The SureFood® VIRUS Hepatitis A PLUS real-time RT-PCR has a limit of detection of ≤ 50 RNA copies. The assay limit of detection depends on RNA preparation and RNA content.

**RNA-preparation**

For RNA-preparation the use of SureFood® PREP DNA/RNA Virus is recommended.

The test assay contains an Internal Control RNA (ICR), which can either be used as PCR inhibition control or as 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 of the ICR should be added to the Master-Mix.

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 added to the specimen-lysis buffer mixture and must not be added directly to the specimen.

**Kit components and storage**

2x	Reaction Mix (700 µl)	<b>(Code 1)</b>
1x	PP-Mix (770 µl)	<b>(Code 2)</b>
1x	Enzyme Mix (80 µl)	<b>(Code 3)</b>
2x	Internal Control RNA (1800 µl)	<b>(Code R)</b>
1x	PCR Water (500 µl)	<b>(Code N)</b>
1x	Positive Control (100 µl)	<b>(Code P)</b>

Store all reagents at -20°C and protected from light.

**Additionally required equipment and materials**

- Real-time PCR instrument, equipped with two detection channels at 522 nm and 553 nm
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, caps)
- Pipettes with filter tips

**Protocol**

1. Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions). Recommended control reactions: negative control, positive control and extraction control. The test assay contains an Internal Control RNA (ICR), which can either be used as PCR inhibition control or as extraction control.

\*note: For users of the Roche LightCycler® 2.0 and 1.5 a Color Compensation is necessary. The use of the SureCC Color Compensation Kit II (Art.-No. S4010) is recommended for the color compensation of such devices.

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 by vortexing and centrifuge before opening and use.

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

Components for 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
<b>Total volume</b>	<b>20.1 µl</b>	<b>221.1 µl</b>

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 for 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
Internal Control RNA	1.0 µl	11.0 µl
Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
<b>Total volume</b>	<b>21.1 µl</b>	<b>232.1 µl</b>

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

2. Setup

	<b>Blockcycler/ Rotorcycler</b>
RT-Reaktion	10 min, 58°C
Denaturierung	1 min, 95°C
Cycles	45
Denaturation	15 sec, 95°C
Annealing/Extension	30 sec, 55°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Detection System: Various devices <b>FAM</b> -channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm  Internal Amplification Control: Various devices <b>VIC/HEX</b> -channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the Congen homepage: <a href="http://www.congen.de/en/information/device-settings-for-surefood-real-time-pcr-kits.html">http://www.congen.de/en/information/device-settings-for-surefood-real-time-pcr-kits.html</a>	