

**SureFast® Influenza A H5/H7/H9 4plex (100 Reakt.)**

Art. Nr. F7139

November 2015

1. Beschreibung

SureFast® Influenza A H5/H7/H9 4plex ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Influenza A H5, Influenza A H7 und Influenza A H9.

2. Testprinzip

Der Nachweis erfolgt im One-Step real-time RT-PCR Format, d. h. die reverse Transkription und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte Influenza A H5, Influenza A H7 bzw. Influenza A H9 RNA wird dabei mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die für Influenza A H5, Influenza A H7 bzw. Influenza A H9 spezifischen Genfragmente werden anschließend mittels real-time PCR amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen.

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 vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm, 553 nm, 610 nm und 670 nm (FAM, VIC, ROX und Cy5) detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II/Cobas® und Applied Biosystems 7500.

3. Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x 700 µl	Gelb
2	PP-Mix	1x 770 µl	Grün
3	Enzyme Mix	1x 80 µl	Röt
R	Internal Control RNA	2x 1800 µl	Braun
N	PCR Water	1x 500 µl	Weiß
P	Positive Control	1x 100 µl	blau

- Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –20°C zu lagern und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden.
- Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. Kühlschrank bei 2 – 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 5 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaften nicht.
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 – 8 °C).

4. Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- RNA -Extraktionskit (z.B. SureFast® PREP DNA/RNA Virus)
- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen 522 nm, 553 nm, 610 nm und 670 nm
- SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) bei Verwendung des LightCycler® 480 (Roche)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Vortexer
- Puderfreie Einmalhandschuhe

* Für die Benutzung des Roche LightCycler® 480 I, II und Cobas ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) verwendet werden.

5. 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.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

6. Protokoll

6.1. RNA-Präparation

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

Dieser Diagnostik 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 µl der ICR dem Master-Mix hinzugefügt werden.

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

6.2 Herstellen des Master-Mix

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

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
Gesamtvolumen	20,1 µl	221,1 µl

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
Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
Internal Control RNA	1,0 µl	11,0 µl
Gesamtvolumen	21,1 µl	232,1 µl

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

6.3 Herstellen des RT-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 PCR Gerät einsetzen und die PCR entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

6.4 Geräteeinstellungen

	LightCycler® 480	Blockcycler
Reverse Transkription	10 min, 58 °C	10 min, 58 °C
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	10 sec, 95°C	15 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 60°C	30 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

6.5 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Dark-Quencher	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	Influenza A H5	465/510	+	SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	ICR	533/580	+	
	Influenza A H7	533/610	+	
	Influenza A H9	618/660	+	
Roche LightCycler® 480 Cobas	Influenza A H5	465/510	+	SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	ICR	540/580	+	
	Influenza A H7	540/610	+	
	Influenza A H9	610/670	+	
Applied Biosystems 7500	Influenza A H5	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	None	
	Influenza A H7	ROX	None	
	Influenza A H9	Cy5	None	
Agilent Mx3000P/ MX3005P	Influenza A H5	FAM	+	-
	ICR	HEX	+	
	Influenza A H7	ROX	+	
	Influenza A H9	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96	Influenza A H5	FAM	+	-
	ICR	VIC	+	
	Influenza A H7	ROX	+	
	Influenza A H9	Cy5	+	

7 Interpretation der Ergebnisse

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

Eine Probe wird **positiv** für Influenza A H5 bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für Influenza A H5 bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikations- bzw. Extraktionskontrolle positiv (VIC/HEX-Kanal) ist.

Eine Probe wird **positiv** für Influenza A H7 bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation im ROX-Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für Influenza A H7 bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation im ROX-Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikations- bzw. Extraktionskontrolle positiv (VIC/HEX-Kanal) ist.

Eine Probe wird **positiv** für Influenza A H9 bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation im Cy5-Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für Influenza A H9 bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation im Cy5-Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikations- bzw. Extraktionskontrolle positiv (VIC/HEX-Kanal) ist.

Eine Probe, die **negativ** für alle Parameter und **negativ** im VIC/HEX-Kanal (interne Amplifikations- 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.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				
FAM-Kanal Influenza A H5	ROX-Kanal Influenza A H7	Cy5-Kanal Influenza A H9	VIC/HEX-Kanal Amplifikations- kontrolle	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv/ negativ	Influenza A H5 RNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/ negativ	Influenza A H7 RNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/ negativ	Influenza A H9 RNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

8 Testmerkmale

Die SureFast® Influenza A H5/H7/H9 4plex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 25 RNA-Kopien.

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

9 Grenzen des Verfahrens

- Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
- Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregion können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit dem SureFast® Influenza A H5/H7/H9 4plex Test zu falsch negativen Ergebnissen führen.
- Wie bei allen auf PCR basierenden Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter der Nachweisgrenze liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.

10 Weitere Informationen

- Validierungsdaten

11 Technischer Support

Fragen zur Durchführung und Auswertung bitte per E-Mail an info@congen.de.

1 Description

The SureFast® Influenza A H5/H7/H9 4plex is a multiplex real-time RT-PCR for the direct, qualitative detection and differentiation test of the influenza A-subtypes H5, H7 and H9.

2 Test principle

The detection is done in a one step real-time RT-PCR format, where the reverse transcription is followed by the PCR in the same reaction tube. The isolated influenza A H5, influenza A H7 and influenza A H9 RNA is transcribed into cDNA by a reverse transcriptase. Gene fragments specific for influenza A H5, influenza A H7 and influenza A H9 are subsequently amplified by real-time PCR. The amplified targets are detected with hydrolysis probes, which are labeled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the presence of a target the probes hybridize to the amplicons.

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 four fluorescence emissions at 522 nm, 553 nm, 610 nm and 670 nm (FAM, VIC, ROX and Cy5) at the same time. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II/Cobas[†] and Applied Biosystems 7500.

3 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2x 700 µl	Yellow
2	PP-Mix	1x 770 µl	Green
3	Enzyme Mix	1x 80 µl	Red
R	Internal Control RNA	2x 1800 µl	Brown
N	PCR Water	1x 500 µl	White
P	Positive Control	1x 100 µl	blue

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used until the expiration date.
- After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Reagents can sustain up to 5 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance.
- During PCR preparation all the reagents should be stored cold in an appropriate way (2 - 8 °C).

4 Additionally required equipment and materials

- RNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP DNA/RNA Virus)
- Real-time PCR instrument, equipped with four detection channels 522 nm, 553 nm, 610 nm and 670 nm
- SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) for use with the LightCycler® 480 (Roche)
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, caps)
- Pipettes with filter tips
- Vortexer
- Powder-free disposal gloves

[†] note: For the use of the Roche LightCycler® 480 I, II and Cobas a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) must be used for the color compensation of such devices.

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.
- Do not use the kit after the expiration date.

5 Protocol**5.1 RNA-preparation**

For RNA -preparation the use of SureFast® 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.

6.2 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 be used as extraction control or inhibition control.

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
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 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
Internal Control RNA	1.0 µl	11.0 µl
Total volume	21.1 µl	232.1 µl

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

6.3 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 PCR instrument and start the run according to the setup.

6.4 Setup

	LightCycler® 480	Blockcyler
Reverse Transkription Initial Denaturation (HOLD)	10 min, 58 °C 1 min, 95°C	10 min, 58 °C 1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	10 sec, 95°C	15 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 60°C	30 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

6.5 Detection Channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection Channel	Dark-Quencher	Note
Roche LightCycler® 480 II	Influenza A H5	465/510	+	SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	ICR	533/580	+	
	Influenza A H7	533/610	+	
	Influenza A H9	618/660	+	
Roche LightCycler® 480 Cobas	Influenza A H5	465/510	+	-
	ICR	540/580	+	
	Influenza A H7	540/610	+	
	Influenza A H9	610/670	+	
Applied Biosystems 7500	Influenza A H5	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none
	ICR	VIC	None	
	Influenza A H7	ROX	None	
	Influenza A H9	Cy5	None	
Agilent Mx3000P/ MX3005P	Influenza A H5	FAM	+	-
	ICR	HEX	+	
	Influenza A H7	ROX	+	
	Influenza A H9	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96	Influenza A H5	FAM	+	-
	ICR	VIC	+	
	Influenza A H7	ROX	+	
	Influenza A H9	Cy5	+	

7 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 influenza A H5, if the sample RNA shows an amplification in the FAM-channel. A sample is stated **negative** for influenza A H5, if the sample RNA shows no amplification in the FAM-channel and the internal amplification control/extraction control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive**.

A sample is stated **positive** for influenza A H7, if the sample RNA shows an amplification in the ROX-channel. A sample is stated **negative** for influenza A H7, if the sample RNA shows no amplification in the ROX-channel and the internal amplification control/extraction control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive**.

A sample is stated **positive** for influenza A H9, if the sample RNA shows an amplification in the Cy5-channel. A sample is stated **negative** for influenza A H9, if the sample RNA shows no amplification in the Cy5-channel and the internal amplification control/extraction 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.

result in the respective channel				
FAM-channel Influenza A H5	ROX-channel Influenza A H7	Cy5-channel Influenza A H9	VIC/HEX-channel amplification control	result
positive	negative	negative	positive/ negative	Influenza A H5 RNA detected
negative	positive	negative	positive/ negative	Influenza A H7 RNA detected
negative	negative	positive	positive/ negative	Influenza A H9 RNA detected
negative	negative	negative	negative	invalid

8 Test characteristics

The SureFast® Influenza A H5/H7/H9 4plex real-time RT-PCR has a limit of detection of ≤ 25 RNA copies. The assay limit of detection depends on sample matrix, RNA preparation and RNA content.

9 Limitations of the method

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions affect the detection of new variants resulting in a false negative result with the SureFast® Influenza A H5/H7/H9 4plex.
- As with all PCR based tests, extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.

10 Product Information

- Validation Report

11 Technical Support

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