

**CONGEN**

**SureFast<sup>®</sup> Norovirus/Hepatitis A 3plex**

Art. No. F7124

100 rxn

**User Manual**



**May 2018**

** Inhalt /  Content**

1	Allgemeines .....	2
1.1	Beschreibung .....	2
1.2	Nachweisgrenze .....	2
1.3	DNA-Präparation .....	2
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung .....	2
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien .....	2
1.6	Geräteeinstellungen .....	3
2	Qualitative Analyse .....	3
2.1	Protokoll .....	3
2.1.1	RNA-Präparation .....	3
2.1.2	Herstellen des Master-Mix .....	3
2.1.3	Herstellen des real-time PCR-Mix .....	4
2.2	Interpretation der Ergebnisse .....	4
3	Weitere Informationen .....	5
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....	5
3.2	Technischer Support .....	5
1	General Information .....	6
1.1	Description .....	6
1.2	Limit of Detection .....	6
1.3	DNA-preparation .....	6
1.4	Kit components and storage .....	6
1.5	Additionally required equipment and materials .....	6
1.6	Setup .....	7
2	Qualitative Analysis .....	7
2.1	Protocol .....	7
2.1.1	RNA Preparation .....	7
2.1.2	Preparation of the master-mix .....	7
2.1.3	Preparation of the real-time PCR-mix .....	8
2.2	Interpretation of results .....	8
3	Further Information .....	9
3.1	Product Information .....	9
3.2	Technical Support .....	9

# 1 Allgemeines

## 1.1 Beschreibung

SureFast® Norovirus/Hepatitis A 3plex ist eine Multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Norovirus (Genogruppe I und II) und Hepatitis A. Der Test ist mit einer Internal Control RNA (ICR, bestehend aus MS2- Bakteriophagen) ausgestattet, die gleichzeitig auch als interne Amplifikationskontrolle verwendet werden kann. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens drei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm, 553 nm und 670 nm (FAM, VIC und Cy5) detektieren können verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® 480 Cobas, Agilent Aria DX, BMS MIC, Applied Biosystems 7500 und Qiagen RotorGene Q.

## 1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Norovirus/Hepatitis A 3plex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 25$  RNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von RNA-Präparation und RNA-Gehalt.

## 1.3 DNA-Präparation

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

## 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 1800 µl	Braun
N	PCR Water	1 x 500 µl	Weiß
P	Positive Control	1 x 100 µl	Hellblau

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

## 1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- RNA-Extraktionskit (z.B. SureFast® PREP DNA/RNA Virus)
- Real-time PCR Gerät mit drei Detektionskanälen (522 nm, 553 nm und 670 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

**1.6 Geräteeinstellungen**

	<b>Rotorcycler/ LightCycler® 480</b>	<b>Rotorgene/ Blockcycler/MIC</b>
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	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	
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase  Nachweisssystem Norovirus: Diverse Geräte <b>FAM</b> -Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green LC480 II 465 nm, 510 nm  Nachweisssystem ICR: Diverse Geräte <b>VIC/HEX</b> -Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow LC480 II 533 nm, 580 nm  Nachweisssystem Hepatitis A: Diverse Geräte <b>Cy5</b> -Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Red LC480 II 618 nm, 660 nm	
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: <a href="http://www.congen.de/unternehmen/download">http://www.congen.de/unternehmen/download</a>		

**2 Qualitative Analyse**

**2.1 Protokoll**

**2.1.1 RNA-Präparation**

Für die RNA-Präparation wird das SureFast® 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 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.

**2.1.2 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 Blank der Extraktion. Dieser Test enthält eine Internal Control RNA (ICR), die als Extraktions- bzw. Inhibitionskontrolle eingesetzt werden kann.

Mai 2018

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.

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

### 2.2 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 Norovirus bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für Norovirus bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle/Extraktionskontrolle **positiv** (VIC/HEX-Kanal) ist.

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

Eine Probe, die **negativ** für alle Parameter und **negativ** im VIC/HEX-Kanal (interne Amplifikationskontrolle/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			Ergebnis
FAM-Kanal Norovirus GGI/GGII	Cy5-Kanal Hepatitis A	VIC/HEX-Kanal Amplifikationskontrolle	
<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv</b>	Norovirus GGI/GGII nachweisbar
negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	Hepatitis A nachweisbar
negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

### 3 Weitere Informationen

#### 3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Validierungsdaten

#### 3.2 Technischer Support

Fragen zur Durchführung und Auswertung bitte per E-Mail an [info@congen.de](mailto:info@congen.de).

## 1 General Information

### 1.1 Description

The SureFast® Norovirus/Hepatitis A 3plex is a multiplex real-time RT-PCR for the direct qualitative detection of norovirus (genogroup I and II) and hepatitis A. The test contains an Internal Control RNA (ICR, consisting of MS2-bacteriophage) as an internal control of sample preparation procedure and to monitor possible PCR-inhibition. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of three fluorescence emissions at 522 nm, 553 nm and 670 nm (FAM, VIC and Cy5) at the same time. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® 480 Cobas, Agilent Aria DX, BMS MIC, Applied Biosystems 7500 and Qiagen RotorGene Q.

### 1.2 Limit of Detection

The SureFast® Norovirus/Hepatitis A 3plex real-time RT-PCR has a limit of detection of  $\leq 25$  RNA copies. The assay limit of detection depends on RNA preparation and RNA content.

### 1.3 DNA-preparation

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

### 1.4 Kit components and storage

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

Store all reagents at  $-20^{\circ}\text{C}$  and protected from light.

### 1.5 Additionally required equipment and materials

- RNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP DNA/RNA Virus)
- Real-time PCR instrument, equipped with three detection channels 522 nm, 553 nm and 670 nm
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, caps)
- Pipettes with filter tips
- disposal gloves
- Vortexmixer
- Centrifuge with a rotor for the reaction tubes

**1.6 Setup**

	<b>Rotorcyclcr/ LightCycler® 480</b>	<b>Rotorgene/ Blockcyclcr/MIC</b>
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	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	
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase  Detection system norovirus: diverse devices <b>FAM</b> -channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q               Green LC480 II                       465 nm, 510 nm  Internal Control RNA: diverse devices <b>VIC/HEX</b> -channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q               Yellow LC480 II                       533 nm, 580 nm  Detetction system hepatitis A: diverse devices <b>Cy5</b> -channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q               Red LC480 II                       618 nm, 660 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/company/downloads">http://www.congen.de/en/company/downloads</a>		

**2 Qualitative Analysis**

**2.1 Protocol**

**2.1.1 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.

**2.1.2 Preparation of the master-mix**

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



May 2018

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.

### 2.1.3 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells or capillaries.
- Close the tube of the negative control (the negative control is ready for PCR without any addition).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells or capillaries.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries.
- Centrifuge all tubes/wells or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/wells or capillaries 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 need to give the correct results.

A sample is stated **positive** for norovirus, if the sample RNA shows an amplification in the FAM-channel. A sample is stated **negative** for norovirus, 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 hepatitis A, if the sample RNA shows an amplification in the Cy5-channel. A sample is stated **negative** for hepatitis A, 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 Norovirus GGI/GGII	Cy5 channel Hepatitis A	VIC/HEX channel Amplification/Extraction control	result
<b>positive</b>	negative	<b>positive</b>	Norovirus GGI/GGII detected
negative	<b>positive</b>	<b>positive</b>	Hepatitis A detected
negative	negative	negative	invalid

### 3 Further Information

#### 3.1 Product Information

- Validation Report

#### 3.2 Technical Support

For further questions please send an e-mail to [info@congen.de](mailto:info@congen.de)