

**SureFast® Hepatitis E PLUS (100 Reakt.)**

Art. Nr. F7142

Januar 2017

**Beschreibung**

SureFast® Hepatitis E PLUS ist eine real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis vom Hepatitis E Virus. 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 zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm und 553 nm (FAM und VIC/HEX) detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche Cobas z 480 Analyzer, Roche LightCycler® 2.0<sup>1</sup>, Applied Biosystems 7500, LTF MyGo Pro sowie am Qiagen RotorGene Q.

**Nachweisgrenze**

Die SureFast® Hepatitis E PLUS real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 25$  RNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von RNA-Präparation und RNA-Gehalt.

**RNA-Präparation**

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

**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°C zu lagern.

**Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien**

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

**Protokoll****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.

<sup>1</sup> Für die Benutzung des Roche LightCycler® 2.0 ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit II (Art. Nr. F4010) verwendet werden.

## 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.

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.

## 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.
- 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.

## 4. Geräteeinstellungen

	<b>Rotorcycler/ LightCycler® 480</b>	<b>Rotorgene/ Blockcycler</b>
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	
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase  Nachweissystem: Diverse Geräte           FAM-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q            Green LC480 II                   465 nm, 510 nm  Nachweissystem ICR: Diverse Geräte           VIC/HEX-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q            Yellow LC480 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/unternehmen/download/">http://www.congen.de/unternehmen/download/</a>		

### 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 E wird im FAM-Kanal nachgewiesen. Die interne Amplifikationskontrolle beziehungsweise die Extraktionskontrolle wird im VIC-Kanal nachgewiesen. Eine Probe wird **positiv** für Hepatitis E bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für Hepatitis E 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 E 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

### Technischer Support

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

**Description**

SureFast® Hepatitis E PLUS is a real-time RT-PCR for the direct and qualitative detection of hepatitis E virus. The test contains an Internal Control RNA (ICR, consisting of MS2-bacteriophage) 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/HEX) at the same time. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche Cobas z 480 Analyzer, Roche LightCycler® 2.0<sup>2</sup>, Applied Biosystems 7500, LTF MyGo Pro and Qiagen RotorGene Q.

**Limit of Detection**

The SureFast® Hepatitis E PLUS 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.

**RNA-preparation**

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

**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 1800 µl	Brown
N	PCR Water	1 x 500 µl	White
P	Positive Control	1 x 100 µl	Light Blue

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

**Additionally required equipment and materials**

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

**Protocol****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.

<sup>2</sup>For the use of the Roche LightCycler® 2.0 a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit II (Art. No. F4010) must be used for the color compensation of such devices.

## 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.

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.

## 3. Preparation of the real-time 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.

4. Setup

	<b>Rotorcyclor/ LightCycler® 480</b>	<b>Rotorgene/ Blockcyclor</b>
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	
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase  Detection system: diverse devices            FAM-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q                Green LC480 II                        465 nm, 510 nm  Internal Control RNA: diverse devices            VIC/HEX-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q                Yellow LC480 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/company/downloads/">http://www.congen.de/en/company/downloads/</a>		

**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 E, if the sample RNA shows an amplification in the FAM-channel. A sample is stated **negative** for hepatitis E, 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

**Technical Support**

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