

**CONGEN**

# **SureFast<sup>®</sup> Hepatitis E PLUS**

Art. No. F7142  
100 rxn

## **User Manual**



**February 2024**

 **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	Geräteeinstellungen .....	4
1.7	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	Weitere Informationen .....	7
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....	7
3.2	Technischer Support .....	7



## **Content**

1	General Information .....	8
1.1	Description .....	8
1.2	Limit of Detection .....	8
1.3	RNA Preparation .....	9
1.4	Kit components and storage .....	9
1.5	Additionally required equipment and materials .....	9
1.6	Setup.....	9
1.7	Detection channel Set-up .....	10
2	Qualitative Analysis .....	11
2.1	Protocol .....	11
2.1.1	Preparation of the master-mix .....	11
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix .....	12
2.2	Interpretation of results .....	12
3	Further Information .....	12
3.1	Product Information.....	12
3.2	Technical Support .....	12

## 1 Allgemeines

### 1.1 Beschreibung

SureFast® Hepatitis E PLUS ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis einer spezifischen RNA-Sequenz von Hepatitis E.

Der Test ist mit einer Internal Control RNA (ICR, bestehend aus MS2- Bakteriophagen) ausgestattet, die gleichzeitig auch als interne Amplifikationskontrolle 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 technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 2.0, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, LTF MyGo Pro und Agilent Mx3005P.

### 1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Hepatitis E PLUS real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 25$  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 2.1.2).

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°C 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 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & Rotor-Gene & R-Biopharm RIDA®CYCLER	LightCycler® 480 II & LTF MyGo Pro
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

## 1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Quencher	Bemerkung
<b>Agilent Mx3005P</b>	Hepatitis E	FAM	+	
	ICR	HEX	+	
<b>Agilent AriaDx /Mx</b>	Hepatitis E	FAM	+	
	ICR	HEX	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	Hepatitis E	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	ICR	VIC	None	
<b>Bio-Rad CFX96/Dx/Opus</b>	Hepatitis E	FAM	+	
	ICR	VIC/HEX	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	Hepatitis E	green	+	
	ICR	yellow	+	
<b>LTF MyGo Pro</b>	Hepatitis E	FAM	+	
	ICR	VIC	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	Hepatitis E	green	+	<b>Achtung:</b> Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein.
	ICR	yellow	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	Hepatitis E	465-510	+	
	ICR	533-580	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	Hepatitis E	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, negative Extraktionskontrolle und Positivkontrolle. Der Reaction Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (ICR), die als positive Extraktions- bzw. Inhibitionskontrolle eingesetzt werden kann.

#### **Benötigte Reaktionen für den qualitativen Hepatitis E -Nachweis:**

3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positivkontrolle)

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
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,1 µl</b>	<b>221,1 µl</b>

**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
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>21,1 µl</b>	<b>232,1 µl</b>

**Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.**

## 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. 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 Gefäße.
- 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 E detektiert. Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle bzw. positive Extraktionskontrolle (ICR) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den Parameter Hepatitis E 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 Positivkontrolle zu erhalten.

Eine Probe wird als **negativ** für den Parameter Hepatitis E bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle bzw. positive Extraktionskontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** mit einer Cp-Abweichung  $\leq 2$  zur Negativkontrolle ist. Sollte die Proben-RNA im VIC/HEX-Kanal **keine Amplifikation** oder eine Cp-Abweichung  $> 2$  zur Negativkontrolle zeigen, sind in der Proben-RNA Inhibitoren enthalten, die die PCR unterdrücken. Ein starker Abfall des Fluoreszenzsignals kann ebenfalls eine Inhibition anzeigen. In diesen Fällen muss die Isolierung und Reinigung der RNA aus der entsprechenden Probe verbessert werden. 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 für Hepatitis E mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

## 3 Weitere Informationen

### 3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: [www.congen.de/unternehmen/download](http://www.congen.de/unternehmen/download))
- Verifizierungsdaten auf Anfrage

### 3.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte per E-Mail an [info@congen.de](mailto:info@congen.de).



## **1 General Information**

### **1.1 Description**

The SureFast® Hepatitis E PLUS is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of a specific RNA sequence of hepatitis E.

Each reaction contains an Internal Control RNA (ICR, consisting of MS2-bacteriophage) as an internal control of sample preparation procedure and to monitor possible PCR-inhibition. 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 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 technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 2.0, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, LTF MyGo Pro and Agilent Mx3005P.

### **1.2 Limit of Detection**

The SureFast® Hepatitis E PLUS real-time PCR has a limit of detection of  $\leq 25$  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 2.1.2).

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°C 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, capillaries, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

**1.6 Setup**

	<b>Blockcyler &amp; Rotor-Gene &amp; R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<b>LightCycler® 480 II &amp; LTF MyGo Pro</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	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

**1.7 Detection channel Set-up**

<b>Real-time PCR device</b>	<b>Detection</b>	<b>Detection channel</b>	<b>Quencher</b>	<b>Note</b>
<b>Agilent Mx3005P</b>	hepatitis E	FAM	+	
	ICR	HEX	+	
<b>Agilent AriaDx /Mx</b>	hepatitis E	FAM	+	
	ICR	HEX	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	hepatitis E	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	ICR	VIC	None	
<b>Bio-Rad CFX96/Dx/Opus</b>	hepatitis E	FAM	+	
	ICR	VIC/HEX	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	hepatitis E	green	+	
	ICR	yellow	+	
<b>LTF MyGo Pro</b>	hepatitis E	FAM	+	
	ICR	VIC	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	hepatitis E	green	+	<b>Note:</b> Please use only 0.1 ml reaction tubes. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	ICR	yellow	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	hepatitis E	465-510	+	
	ICR	533-580	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	hepatitis E	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, negative extraction control, 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.

**Reactions needed for the** qualitative hepatitis E 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
<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 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
<b>Total volume</b>	<b>21.1 µl</b>	<b>232.1 µl</b>

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

### 2.1.2 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 of PCR Water into the designated tubes and close them.
- 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.
- Centrifuge all tubes/plates or capillaries 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 E 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 E, 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 internal amplification control (IAC) is not needed to obtain a positive result of the positive control.

A sample is stated **negative** for hepatitis E, 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** with a shift in Cp-Value  $\leq 2$  compared to the negative control. If the sample RNA in the VIC/HEX-Channel shows **no amplification** or a shift in Cp-value  $> 2$  compared to the negative control, it contains PCR inhibiting substances. A significant decrease in the fluorescence signal can also show the presence of PCR inhibiting substances. Under these circumstances RNA isolation and purification of the sample need to be improved. 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 hepatitis E PCR assay.

## 3 Further Information

### 3.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices  
(Download: [www.congen.de/en/company/downloads](http://www.congen.de/en/company/downloads))
- Validation Report upon request

### 3.2 Technical Support

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