

HAVrealIDTECT

Zum Nachweis von **HAV-RNA** mit real time RT-PCR
im Platten- oder Kapillarformat

Deutsch

For the detection of **HAV-RNA** by means of real time RT-PCR
For use in plate or capillary format

English

Nur zu Forschungszwecken!
Nicht zur diagnostischen Anwendung geeignet.

For Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.



50 rx

REF

HAV-RD50



Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

 : Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany
Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10
E-Mail: contact@mediagnost.de • <http://www.mediagnost.de>

EN/ DE/ FR/ IT/ ES/ PT/ NL/ DK/ SE/ PL/ HU/ SK/ CZ/ BG/ EE/ GR/ RO/ SL/ FI

**Symbols / Symbole / Symboles / Simboli / Símbolos / Símbolos/ Symbolen / Symboler /
Symboler / Symbole / Szimbólumok / Symboly / Symboly / Символи / Sümbolid / Σύμβολα /
Simboluri / Simboli / Symbolit**

DIN EN ISO 15223-1



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Bäst före-datum / Termin ważności / Lejárati idő / Čas expirácie / Doba expirace / Срок на годност / Aegumiskuupäev / Ημερομηνία λήξης / Data de expirare / Rok uporabe / Viimeinen käyttöpäivä



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de uso / Respeitar as instruções de utilização / A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit./ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vă rugăm să respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštevajte navodila za uporabo! / Lue käyttöohje huolellisesti!



Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii – partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ erä



Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd door/Fabrikation af/Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produz de/ Proizvajalec/ Valmistaja



Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Каталожен номер/Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ viite tai tilausnumero



Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. Entre/ Armazénar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilitada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenido suficiente per x test / Contenido suficiente para x pruebas / Conteúdo suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Inneholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma x teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsah dostahuje pro x testů / Съдържание достатъчно за x тестове / Sisust jätkub x katse jaoks / Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές / Conținut suficient pentru x teste / Vsebina zadostuje za x preizkusov / Sisältö riittää x testille



Keep away from sunlight / Nicht dem Sonnenlicht aussetzen / Conserver à l'abri de la lumière / Conservare al riparo della luce solare / No exponer a la luz solar / Proteger da luz solar / Niet aan zonlicht blootstellen / Må ikke udsættes for sollys / Utsätt inte för solljus / Nie wystawiać na słońce / Napfénytől távol tartandó / Nevystavovat' slnečnému svetlu / Nevystavovat slunečnímu světlu / Да се предпазва от слънчева светлина / Kaitsta otsese päikesekiirguse eest / Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία / Τηνεji departe de lumina soarelui / Ne izpostavljajte sončni svetlobi / suojaa auringonvalolta

Nur zu Forschungszwecken.

Nicht für humane oder tierische, therapeutische oder diagnostische Zwecke.

Nur zum In-vitro-Gebrauch.

Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal.

Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

For Research Use Only!

Not for use in diagnostic procedures!

CAUTION: Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

For in vitro use only!

For professional use only!

Read entire protocol before use!

Inhaltsverzeichnis

Symbols / Symbole	2
2. Prinzip und Anwendung	4
3. Spezifität und Sensitivität	4
4. KIT- Inhalt.....	5
5. Lagerung	5
6. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	5
7. Vorsichtsmaßnahmen	5
8. Prinzip der real time PCR.....	5
9. Durchführung der one-step real time RT-PCR	6
10. Thermocycler Protokoll.....	6
Information for use English Page	8

Exemplary version - do not use for assay accomplishment!
Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

1. Anwendungsbereich

Das HAVrealDETECT Kit dient zum Nachweis viraler RNA des Hepatitis A Virus mittels real time reverser Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR). Das Kit ist gebrauchsfertig und enthält einen Mastermix sowie einen Enzym-Mix für die spezifische Amplifikation der aus dem Probenmaterial (Serum oder Stuhl) nach bekannten Methoden extrahierten HAV-RNA. Das Kit kann sowohl im Kapillarformat z.B. LightCycler® (Roche) als auch im Plattenformat, z.B. iQ5 (Biorad) oder Taqman® (ABI) verwendet werden. Der Mastermix enthält eine FAM markierte Taqman Sonde und einen Referenz Farbstoff zur Normalisierung des Fluoreszenzsignals, der im ROX Kanal gemessen wird. Zur Quantifizierung der viralen RNA enthält das Kit einen Quantifizierungsstandard: QS1 bis QS4 mit $1,3 \times 10^2$ bis $1,3 \times 10^5$ Kopien/ Reaktion.

2. Prinzip und Anwendung

Die Hepatitis A Erkrankung wird durch das Hepatitis A Virus verursacht und ist in Deutschland für etwa 50% aller akut viral bedingten Leberentzündungen verantwortlich. HAV wird meist fäkal-oral, in seltenen Fällen parenteral übertragen. Die Übertragung erfolgt über kontaminierte Lebensmittel, vor allem Meeresfrüchte, Obst, Eis oder Salat und Wasser.

3. Spezifität und Sensitivität

Das Primer-Sondensystem wurde nach einer Datenbankanalyse der dazu korrespondierenden HAV-Region von 100 veröffentlichten HAV-Sequenzen ausgewählt. Das System detektiert alle human relevanten HAV-Genotypen. Eine Kreuzreaktivität mit Organismen aus der nachfolgenden Tabelle wird nicht nachgewiesen.

HIV Genotyp 1a
HIV Genotyp 1b
HCV Genotyp 1a
HCV Genotyp 1b
HEV
Coxsackie A7
Coxsackie A9
Echovirus 4
Echovirus 15
Echovirus 20
Norwalk Genotyp II
Rotavirus

Zur Bestimmung der Testsensitivität wurde eine Verdünnungsreihe von 0,3 IU/mL bis 1000 IU/mL des NIBSC Standards (WHO International Standards for Hepatitis A Virus (HAV) RNA Nucleic Acid Amplification (NAT) assays, NIBSC code 00/560) hergestellt und analysiert. Die Nachweisgrenze des Kits liegt bei ≥ 30 IU/mL.

4. KIT- Inhalt

	Produkt Code HAV-RD50
Inhalt	Für 50 Reaktionen à 20 µL
2 x 425 µL	HAV-Master
1 x 50 µL	Enzym-Mix
2 x 50 µL	QS1 1,3 x 10 ² Kopien pro Reaktion
2 x 50 µL	QS2 1,3 x 10 ³ Kopien pro Reaktion
2 x 50 µL	QS3 1,3 x 10 ⁴ Kopien pro Reaktion
2 x 50 µL	QS4 1,3 x 10 ⁵ Kopien pro Reaktion

5. Lagerung

Die Komponenten von HAVrealDETECT werden bei –20°C gelagert und sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren (>2x) sollte vermieden werden. Der Enzym-Mix muss bei –20°C gelagert werden.

6. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

Puderfreie Handschuhe
RNA Isolierungskit
Einstellbare Pipetten
Sterile Pipettenspitzen mit Filter
Vortex-Mixer
Real time PCR-Gerät

7. Vorsichtsmaßnahmen

RNA ist sehr empfindlich gegenüber dem Abbau durch Nukleasen. Daher wird dringend die Verwendung von sterilen Einmalmaterialien empfohlen. Es wird empfohlen, ein Extraktionskit zur Gewinnung der Nukleinsäure aus dem Probenmaterial zu verwenden. RNA Isolierungskits werden von verschiedenen Herstellern angeboten. Entsprechend des jeweiligen Protokolls wird eine bestimmte Menge des Probenmaterials aufgereinigt und in die Reaktion eingesetzt.

Probenaufarbeitung und Durchführung der RT/PCR sollten räumlich getrennt erfolgen.

Alle Komponenten sind entsprechend der Gebrauchsanweisung zu verwenden und zu lagern.

8. Prinzip der real time PCR

Mittels der RT-PCR werden spezifische Regionen aus dem nachzuweisenden Organismus amplifiziert. Diese Genombereiche definieren sich über die Auswahl des Primer-Sonden-Systems. Die Detektion bei der real time PCR erfolgt über die Messung der Fluoreszenz, d.h. je mehr Amplifikat entsteht desto mehr Fluoreszenz wird freigesetzt und kann gemessen werden. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist direkt proportional der Menge der nachzuweisenden HAV-RNA im Probenmaterial.

9. Durchführung der one-step real time RT-PCR

Anzahl Proben	1	1. Ansetzen des Mastermixes
HAV-Master	17 μL	
Enzym-Mix	1 μL	
Gesamtvolumen	18 μL	

In einem sterilen Reaktionsgefäß (PCR geeignet) werden 17 μL HAV-Master pro Probe und 1 μL Enzym-Mix pro Probe gemischt.

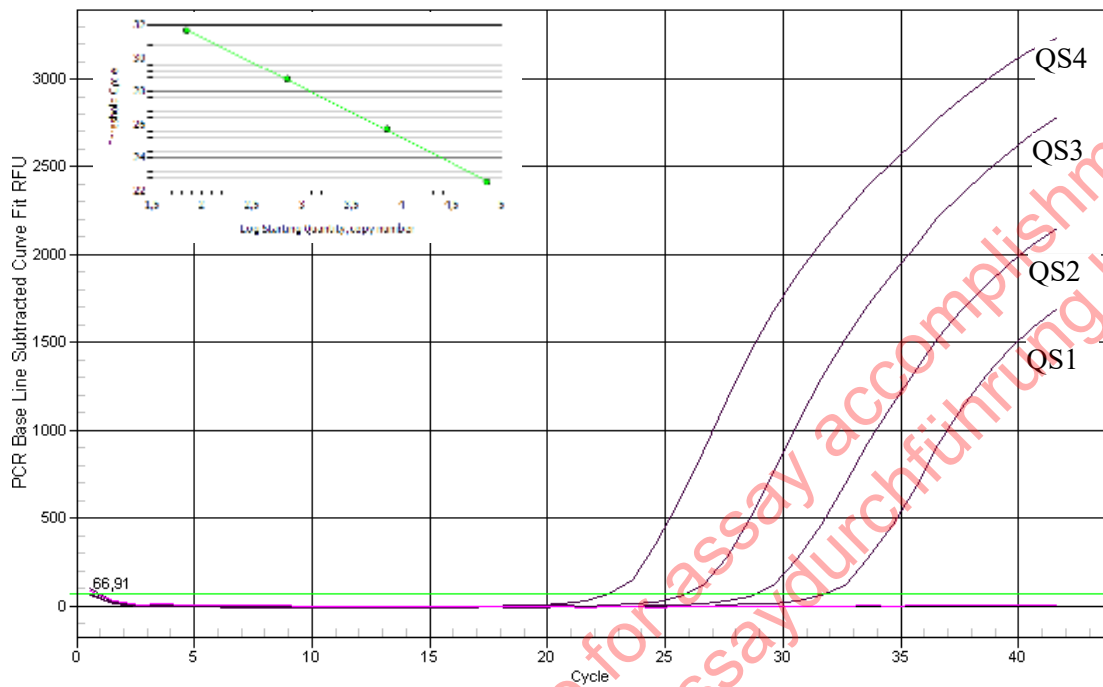
Pro Reaktion		2. Ansetzen der RT-PCR
Mastermix	18 μL	
Probe	2 μL	
Gesamtvolumen	20 μL	

In für real time PCR geeignete Reaktionsgefäße (Strips, Platte, Kapillaren) werden zu je 18 μL Mastermix 2 μL Probe pipettiert, die jeweiligen Reaktionsgefäße werden verschlossen und zur Durchführung der RT-PCR in das real time Gerät gestellt.

10. Thermocycler Protokoll

CYCLE STEP	TEMPERATUR	Zeit	CYCLES
Reverse Transkription	55°C	10 Minuten	1
Initiale Denaturierung	95°C	1 Minute	1
Denaturierung	95°C	10 Sekunden	45
Extension	60°C	60 Sekunden (+ plate read)	

Abb. 1: Serielle Verdünnung des Quantifizierungsstandards QS1-QS4 von $1,3 \times 10^2$ bis $1,3 \times 10^5$ Kopien/Reaktion und die resultierende Standardkurve.



Exemplary version - do not use for assay accomplishment!
Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

Table of Contents

Symbols	2
1. Intended use.....	9
2. Principle.....	9
3. Specificity and Sensitivity	9
4. KIT- Contents	10
5. Storage.....	10
6. Required Materials Not Provided.....	10
7. Precautions	10
8. Principle of the real time PCR	10
9. Procedure of the one-step real time RT-PCR.....	11
10. Thermocycling protocol	12

Exemplary version - do not use for assay accomplishment!
Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

1. Intended use

The HAVrealDETECT Kit is suited for the detection of viral RNA from Hepatitis A Virus by means of real time Reverse Transcriptase Polymerase-Chain-Reaction (RT-PCR). The Kit is ready to use and contains a Mastermix and an Enzyme-Mix for the specific amplification of HAV-RNA extracted by an approved method from the sample material (serum or stool), for use with LightCycler® (Roche) as well as for Taqman® Platforms, (ABI or Biorad). The Mastermix contains a FAM labelled Taqman probe and an internal reference dye for fluorescent signal normalization which is detected in ROX channel. For quantification of the viral RNA the kit contains the quantification standards: QS1 to QS4 with 1.3×10^2 copies/reaction to 1.3×10^5 copies/reaction.

2. Principle

Hepatitis A is caused by the Hepatitis A Virus (HAV) and is responsible for about 50% of all viral caused inflammations of the liver in Germany. HAV is mostly transmitted faecal-orally, very rarely parenterally. The virus is excreted in stools and transmitted through contaminated food, especially raw seafood, ice cream, fruit, salad or polluted drinking water.

3. Specificity and Sensitivity

The primer/probe system was selected according to data bank analysis of the corresponding HAV-region of 100 published HAV-sequences. This system detects all human relevant HAV-genotypes.

Cross reactivity with organisms listed in the table below was NOT detected.

HIV Genotype 1a
HIV Genotype 1b
HCV Genotype 1a
HCV Genotype 1b
HEV
Coxsackie A7
Coxsackie A9
Echovirus 4
Echovirus 15
Echovirus 20
Norwalk Genotype II
Rotavirus

For determination of the sensitivity dilution series (0.3 IU/mL to 1000 IU/mL) of the NIBSC Standard (WHO International Standards for Hepatitis A Virus (HAV) RNA Nucleic Acid Amplification (NAT) assays, NIBSC code 00/560) were prepared. The analysed detection limit of the kit is ≥ 30 IU/mL.

4. KIT- Contents

	Product Code HAV-RD50
Content	Number of Reactions 50
2 x 425 µL	HAV-Master
1 x 50 µL	Enzyme-Mix
2 x 50 µL	QS1 1.3 x10 ² copies/reaction
2 x 50 µL	QS2 1.3 x10 ³ copies/reaction
2 x 50 µL	QS3 1.3 x10 ⁴ copies/reaction
2 x 50 µL	QS4 1.3 x10 ⁵ copies/reaction

5. Storage

The components of HAVrealDETECT have to be stored at –20°C and are stable to the expiry date given on the label. Please avoid repeated thawing and freezing (>2x). The Enzyme-Mix must be stored at –20°C.

6. Required Materials Not Provided

Powder-free gloves
RNA isolation kit
Adjustable pipettes
Sterile pipette tips with filter
Vortex-mixer
Real time PCR-instrument

7. Precautions

RNA is very sensitive to degradation through nucleases. Therefore use of sterile disposable materials for RNA handling is highly recommended. It is recommended to use an RNA isolation kit offered by various manufacturers for extraction of the nucleic acid from the sample material. Regarding the respective protocols a certain quantity of the sample material is purified and used in the reaction.

Sample preparation, set-up of RT/PCR and detection of the amplicons should be spatially separated.

All components should be used and stored regarding to the instructions.

8. Principle of the real time PCR

Specific regions of the organism to be determined are amplified by means of the RT-PCR. These genome regions are defined by choice of the primer/probe-systems. The detection by means of real time RT-PCR is carried out by fluorescence measurement, i.e. the more amplicon is generated the more fluorescence is released and can be measured. The intensity of the measured fluorescence is directly proportional to the quantity of the HAV-RNA to be determined in the sample material.

9. Procedure of the one-step real time RT-PCR

Number of Samples	1	1. Preparation of the Mastermix
HAV-Master	17 μ L	
Enzyme-Mix	1 μ L	
Total volume	18 μ L	

Preparation of the Mastermix

17 μ L HAV-Master per reaction and 1 μ L Enzyme-Mix per reaction are mixed in a sterile reaction tube (suitable for PCR).

Per reaction		2. Set-up of the RT-PCR reaction
Mastermix	18 μ L	
Sample	2 μ L	
Total volume	20 μ L	

Set-up of the RT-PCR

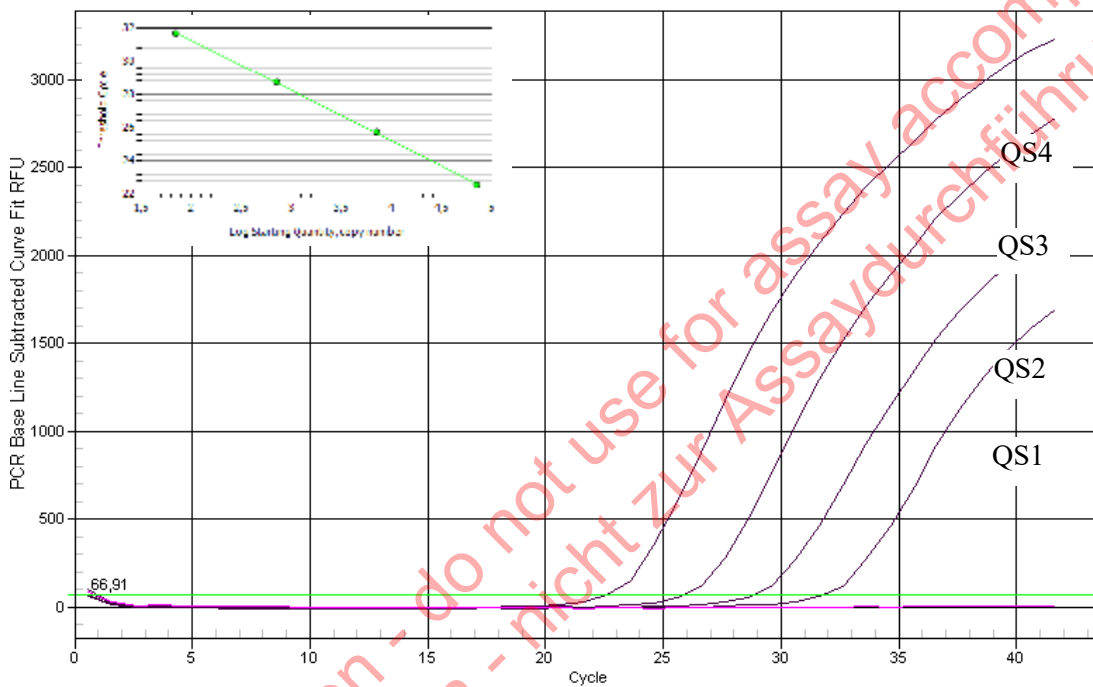
18 μ L Mastermix are added to 2 μ L sample in reaction tubes suitable for real time PCR (capillaries, plate, strips etc.). The reaction tubes are closed and transferred to the real time PCR cycle for the RT-PCR.

Exemplary version - do not use for assay accomplishment!
Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

10. Thermocycling protocol

CYCLE STEP	TEMPERATURE	TIME	CYCLES
Reverse Transcription	55°C	10 minutes	1
Initial Denaturation	95°C	1 minute	1
Denaturation	95°C	10 seconds	45
Extension	60°C	60 seconds (+ plate read)	

Fig.1: Serial dilution of the quantification standard QS1-QS4 from 1.3×10^2 copies/reaction to 1.3×10^5 copies/reaction and the resulting standard curve.



Exemplary version - do not use for assay accomplishment!
 Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!