

# MutaPLEX<sup>®</sup> FSME (TBE) real time RT-PCR kit

*Test für den in-vitro-Nachweis der RNA des  
Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus  
in extrahierten klinischen Proben und Zecken*

*Test for the in vitro detection of RNA of  
the tick-borne encephalitis virus (TBE)  
extracted from clinical samples and ticks*

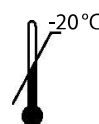
Gültig ab / Valid from 2018-11-19



**KG1916032**  
**KG1916096**



32/96



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Inhalt

<b>1</b>	<b>VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>TESTPRINZIP</b>	<b>1</b>
<b>4</b>	<b>INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>5</b>	<b>ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>2</b>
<b>6</b>	<b>TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT</b>	<b>3</b>
<b>7</b>	<b>WICHTIGE HINWEISE</b>	<b>3</b>
<b>8</b>	<b>ALLGEMEINE HINWEISE</b>	<b>3</b>
<b>9</b>	<b>PROBENMATERIAL</b>	<b>4</b>
<b>10</b>	<b>PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<b>11</b>	<b>KONTROLL-RNA</b>	<b>4</b>
	<i>RNA-Isolation aus klinischen Proben</i>	<i>4</i>
<b>12</b>	<b>REAL-TIME-RT-PCR</b>	<b>5</b>
	<i>12.1 Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	<i>5</i>
	<i>12.2 Durchführung</i>	<i>5</i>
	<i>12.3 Geräteeinstellungen</i>	<i>7</i>
<b>13</b>	<b>INTERPRETATION DER ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>14</b>	<b>VALIDIERUNGSDATEN</b>	<b>9</b>
<b>15</b>	<b>EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>10</b>
<b>16</b>	<b>PROBLEMBEHANDLUNG</b>	<b>10</b>
<b>17</b>	<b>LEISTUNGSDATEN</b>	<b>12</b>
	<i>17.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität</i>	<i>12</i>
	<i>17.2 Analytische Sensitivität</i>	<i>12</i>
	<i>17.3 Analytische Spezifität</i>	<i>13</i>
<b>18</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b>	<b>15</b>

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR-Kit dient dem Nachweis der RNA des Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus in extrahierten klinischen Proben und Zecken mittels Real-time-RT-PCR in offenen Real-time-PCR-Systemen.

## 2 EINLEITUNG

Frühsommermeningoenzephalitis (FSME) wird vom durch Zecken übertragenen FSME-Virus verursacht. Die charakteristischen Symptome sind grippeähnlich, oft manifestiert sich die FSME jedoch als Meningitis, Enzephalitis oder Meningoenzephalitis. Die meisten Patienten zeigen nach einer Infektion allerdings keine Symptome. Die Infektion erfolgt über den Stich einer infizierten Zecke (vorwiegend *Ixodes ricinus*, der Gemeine Holzbock).

Eine ursachenorientierte Behandlung der FSME ist nicht möglich. Neben allgemeinen vorbeugenden Maßnahmen wie dem Absuchen des Körpers auf Zecken ist die effizienteste Vorbeugung eine Impfung, die für alle Personen in Hochrisikogebieten empfohlen wird.

Eine zuverlässige Diagnose kann anhand der Symptome, des Krankheitsverlaufs, der Anamnese und serologischen Befunden erstellt werden.

Um das Risiko einer FSME-Infektion nach einem Zeckenstich besser zu beurteilen, kann die Zecke selbst mittels Real-time-RT-PCR auf das Vorhandensein der FSME-Virus-RNA untersucht werden.

Für FSME gibt es keine Heilbehandlung, die Therapie ist auf Symptombehandlung beschränkt. In schweren Fällen werden Interferone verabreicht. Bettruhe und Verdunkelung des Krankenzimmers können bei der Vermeidung von Komplikationen helfen.

## 3 TESTPRINZIP

Der MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR-Kit enthält spezifische Primer und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden für den Nachweis der FSME-RNA in klinischen Probenextrakten und Zecken nach vorausgegangener RNA-Extraktion.

Die Reverse Transkription (RT) der möglicherweise enthaltenen viralen RNA zu cDNA und die anschließende Amplifikation von erregerspezifischen Fragmenten mittels PCR erfolgen in einem Schritt. Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der FSME-Virus-spezifischen Fluoreszenzsonden. Die Detektion erfolgt im FAM-Kanal.

Zusätzlich verfügt der MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR-Kit über eine Kontroll-RNA, die während der Extraktion zugefügt und in einem heterologen Amplifi-

kationssystem nachgewiesen wird. Dies ermöglicht zum einen das Aufdecken von Fehlern bei der RNA-Extraktion, zum anderen kann eine mögliche Inhibition der Reversen Transkription oder der PCR identifiziert werden. Dadurch wird das Risiko von falsch-negativen Ergebnissen reduziert. Die Detektion der RNA-Extraktionskontrolle erfolgt im VIC®/HEX/JOE/TET- Kanal.

## 4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 (KG1916096) bzw. 32 (KG1916032) Nachweisreaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR-Kits

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Reaction Mix	gelb	1 x 506 µl	2 x 759 µl
Enzyme	blau	1 x 6,4 µl	1 x 19,2 µl
Positive control	rot	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Negative control	grün	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Control RNA	transparent	1 x 160 µl	2 x 240 µl

## 5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- RNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038, oder MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1023/KG1024)
- steriles Wasser, geeignet für PCR-Anwendung
- Sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortex-Wirbelmischer
- Real-time-PCR-Gerät
- optische PCR-Gefäße mit Deckel
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

## 6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR-Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  zu lagern. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Nach Anbruch der Reagenzien sind diese für maximal sechs Monate verwendbar und können bei  $2-8^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Bis zu 20 Frier-Tau-Zyklen sind möglich.

Schützen Sie den Test während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

## 7 WICHTIGE HINWEISE

- Die MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die Richtlinien der *Good Laboratory Practice* (GLP) sind einzuhalten.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.

## 8 ALLGEMEINE HINWEISE

- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.

## 9 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist virale RNA, die aus klinischen Proben oder Zecken extrahiert wurde.

## 10 PROBENVORBEREITUNG

Die MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR ist geeignet für den Nachweis von FSME-RNA, die zuvor aus klinischen Proben mit Hilfe geeigneter Methoden isoliert wurde. Kommerziell erhältliche Extraktionskits können zur RNA-Isolierung verwendet werden. Immundiagnostik empfiehlt MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038). Es wird empfohlen, Zecken vor der RNA-Extraktion gemäß den Angaben des Extraktionskitherstellers mechanisch aufzuschließen.

**Wichtig:** Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (steriles Wasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer Probe behandelt werden.

**Beachten Sie bitte auch Kapitel 11 (Kontroll-RNA).**

Falls die Real-time-RT-PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die RNA-Extrakte entsprechend den Angaben des RNA-Extraktionskitherstellers aufbewahrt werden.

## 11 KONTROLL-RNA

Der MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR-Kit enthält eine Kontroll-RNA, die zum einen als RNA-Extraktionskontrolle dient, zum anderen als interne Kontrolle mögliche Inhibitionen der Reversen Transkription bzw. der PCR aufzeigt.

### *RNA-Isolation aus klinischen Proben*

#### **a) Kontroll-RNA als Extraktionskontrolle**

MutaPLEX® FSME (TBE) Kontroll-RNA zur RNA-Extraktion geben.

5 µl Kontroll-RNA zu jeder Extraktion\* zugeben (5 µl x (N+1)), gut mischen. Führen Sie die RNA-Isolation gemäß der Anleitung des Herstellers durch. Setzen Sie anschließend die Real-time-RT-PCR nach Protokoll A an.

**Wichtig:** Wird die Probe im ersten Puffer des Extraktionskit inkubiert, so wird die Kontroll-RNA erst **nach der Inkubation jeder Probe** einzeln zugefügt, d. h. die Kontroll-RNA darf dem Probenmaterial **nicht direkt** zugemischt werden!

**\* Die Kontroll-RNA muss dem ersten Puffer (Lysepuffer) des Extraktionskits zugesetzt werden.**

## b) Kontroll-RNA als interne Kontrolle der Real-time-RT-PCR

Falls keine Kontrolle der RNA-Extraktion gewünscht sein sollte, wohl aber eine Kontrolle der RT-PCR, so kann die Kontroll-RNA erst beim Ansetzen der PCR zugegeben werden. In diesem Fall ist die Real-time-RT-PCR nach Protokoll B anzusetzen.

## 12 REAL-TIME-RT-PCR

### 12.1 Wichtige Hinweise vor Beginn

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Wichtige Hinweise“).
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR-Lauf mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Alle Reagenzien müssen komplett aufgetaut, gründlich gemischt und kurz anzentrifugiert werden.
- Wir empfehlen, die Reagenzien stets in einem Kühlblock (+2 bis +8°C) oder auf Eis zu kühlen.

### 12.2 Durchführung

Falls die Kontroll-RNA als echte Extraktionskontrolle verwendet wird, bitte Protokoll A folgen. Wird die Kontroll-RNA lediglich zur Kontrolle einer möglichen Inhibition der Real-time-RT-PCR verwendet, bitte Protokoll B befolgen.

#### Protokoll A

**Die Kontroll-RNA wurde bereits zur RNA-Extraktion zugegeben** (siehe Kapitel 11 „Kontroll-RNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 2 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 2: Herstellung des Master-Mix (Kontroll-RNA wurde während der RNA-Extraktion zugefügt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
15,8 µl Reaction Mix	15,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzyme	0,2 µl x (N+1)

## Protokoll B

Die Kontroll-RNA wird ausschließlich zur Kontrolle der Real-time-RT-PCR verwendet (siehe Kapitel 11 „Kontroll-RNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 3 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

**Wichtig:** Verdünnen Sie die **Kontroll-RNA 1:10** in sterilem Wasser (z. B. 1 µl Control RNA + 9 µl steriles Wasser) vor Zugabe zum Master-Mix.

Tabelle 3: Herstellung des Master-Mix (die Kontroll-RNA wird dem Master-Mix beigemischt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
15,8 µl Reaction Mix	15,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzyme	0,2 µl x (N+1)
0,2 µl Control RNA* <b>1:10 verdünnt</b>	0,2 µl x (N+1)*

\* Die durch Zugabe der Kontroll-RNA verursachte Volumenerhöhung kann vernachlässigt werden. Die Sensitivität des Nachweissystems ist dadurch nicht beeinträchtigt.

## Protokoll A und B: Ansetzen der Real-time-RT-PCR

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in den Kühlblock des Real-time-PCR-Geräts stellen.
- 16 µl des Master-Mix in jedes Gefäß pipettieren.
- 4 µl der RNA-Eluat (inklusive des Eluats der Wasserkontrolle), die Positivkontrolle und die Negativkontrolle in die entsprechenden Gefäße pipettieren (Tabelle 4).
- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 4: Ansetzen der Real-time-RT-PCR

Komponente	Volumen
Master-Mix	16,0 µl
Probe	4,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl



### 12.3 Geräteeinstellungen

Für die Real-time-RT-PCR ist das in Tabelle 5 beschriebene Temperaturprofil zu benutzen.

Tabelle 5: Real-time-RT-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Reverse Transkription	20 min	45 °C	1
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1
cDNA-Amplifikation			45
Denaturierung	10 s	95 °C	
Annealing	20 s	60 °C	
Extension	10 s	72 °C	
	Messung am Ende dieses Schrittes		

Abhängig vom verwendeten Real-time-Gerät müssen noch weitere, in Tabelle 6 aufgelistete Einstellungen vorgenommen werden.

Tabelle 6: Überblick über die für die MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR benötigten Geräteeinstellungen

Real-time-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen	
LightCycler 480I	FSME-Virus Kontroll-RNA	483–533 523–568	Farbkompensationskit benötigt, z. B. der vorinstallierte Universal CC FAM (510) – VIC (580)	
LightCycler 480II	FSME-Virus Kontroll-RNA	465–510 533–580		
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	FSME-Virus Kontroll-RNA	FAM HEX	Gain 8 Gain 1	Reference Dye: None
ABI 7500	FSME-Virus Kontroll-RNA	FAM JOE	Option Reference Dye ROX: NO	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	FSME-Virus Kontroll-RNA	Grün Gelb	Gain 5 Gain 5	
Mic qPCR Cyclers	FSME-Virus Kontroll-RNA	Grün Gelb	Gain 8 Gain 10	

## 13 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die FSME-Virus-spezifische Amplifikation wird im FAM-Kanal detektiert. Die Amplifikation der Kontroll-RNA wird im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal gemessen.

### Folgende Ergebnisse können auftreten:

- **Im FAM-Kanal wird ein Signal detektiert:**

#### **Das Ergebnis ist positiv, die Probe enthält FSME-Virus-RNA.**

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal nicht notwendig, da eine hohe FSME-Virus-cDNA-Konzentration zu einem verminderten bzw. fehlenden Fluoreszenzsignal der Kontroll-RNA führen kann (Kompetition).

- **Im FAM-Kanal wird kein Signal detektiert, jedoch im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal:**

#### **Das Ergebnis ist negativ, die Probe enthält keine FSME-Virus-RNA.**

Das detektierte Signal der Kontroll-RNA schließt die Möglichkeit einer fehlerhaften RNA-Extraktion aus (falls die Kontroll-RNA als Extraktionskontrolle benutzt wurde). Außerdem sind weder die reverse Transkription noch die PCR komplett inhibiert. Unterscheidet sich der CT-Wert der internen Kontrolle der Wasserkontrolle stark von dem der Probe, so liegt eine teilweise Inhibition vor, die dazu führen kann, dass schwach positive Proben nicht erkannt werden (siehe Kapitel „Problembehandlung“).

- **Weder im FAM- noch im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal wird ein Signal detektiert:**

#### **Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden.**

Die Real-time-RT-PCR wurde inhibiert oder es trat ein Fehler bei der RNA-Extraktion auf. Wurde die Kontroll-RNA während der RNA-Extraktion zugefügt und nicht direkt in den PCR-Master-Mix gegeben, dann ist die negative Kontrolle in beiden Kanälen negativ.

Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen Beispiele für positive und negative Real-time-RT-PCR-Ergebnisse.

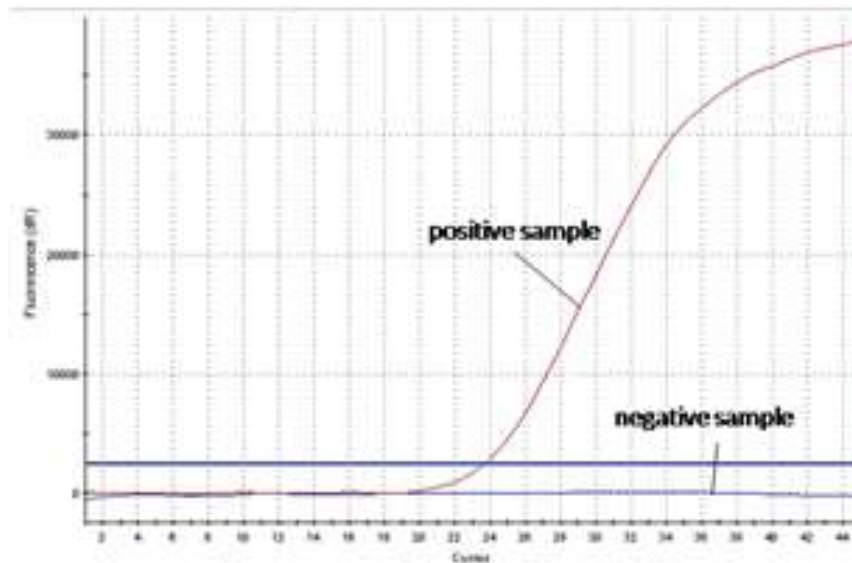


Abb. 1: Die positive Probe zeigt eine starke Amplifikation im viruspezifischen FAM-Kanal, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

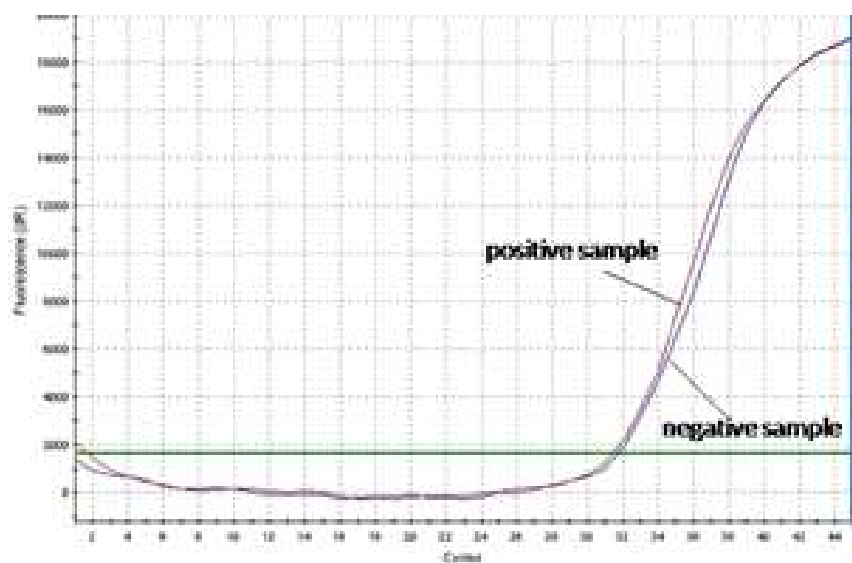


Abb. 2: Im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal zeigen sowohl die positive als auch die negative Probe ein Signal. In diesem Fall liegt keine Inhibition der Real-time-RT-PCR vor, auch verlief die RNA-Extraktion erfolgreich. Die negative Probe ist somit als tatsächlich negativ zu werten.

## 14 VALIDIERUNGSDATEN

Stellen Sie die Grenzwerte des Real-time-Geräts wie im Folgenden beschrieben ein.

### Negativkontrollen

Alle Negativkontrollen sollten unter dem Grenzwert liegen. Im Falle einer möglichen Kontamination (Auftreten einer Kurve in der Negativkontrolle oder einer Anhäufung von Kurven in Proben mit hohem CT, beispielsweise über 36) sind die erhaltenen Er-

gebnisse nicht interpretierbar und der gesamte Lauf (inklusive der Extraktion) muss wiederholt werden.

### **Positivkontrollen**

Alle Positivkontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Die Positivkontrollen müssen unter einen CT-Wert von 30 fallen.

### **Interne Kontrollen**

Alle internen Kontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Der CT-Wert der internen Kontrolle muss unter 33 liegen. Falls der CT-Wert der internen Kontrolle über 34 liegt, deutet dies auf ein RNA-Aufreinigungsproblem oder eine stark positive Probe hin, welche die interne Kontrolle inhibieren kann. In letzterem Fall ist das Testergebnis valide. Falls eine Wasserkontrolle durchgeführt wurde, muss der CT-Wert der internen Kontrolle unter 33 liegen.

## **15 EINSCHRÄNKUNGEN**

Die Ergebnisse müssen stets im Kontext der klinischen Symptome betrachtet werden. Therapeutische Entscheidungen sollten unter Berücksichtigung klinischer Daten getroffen werden.

Ein negatives Testergebnis schließt eine FSME-Virus-Infektion nicht aus.

## **16 PROBLEMBEHANDLUNG**

Die folgenden Problembeschreibungen sollen bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-time-RT-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen, haben wenden Sie sich bitte direkt an Immundiagnostik.

### **Kein Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal der Positivkontrolle**

#### ***Der gewählte entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen Kanal***

Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der virusspezifischen Amplifikation und den VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-RNA.

#### ***Fehlerhaftes Ansetzen der Real-time-RT-PCR***

Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den im Kapitel „Durchführung“ beschriebenen Schritten.

#### ***Fehlerhaftes Real-time-RT-PCR-Temperaturprofil***

Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (Tabelle 5).

***Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum***

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

**Schwaches oder kein Signal der Kontroll-RNA und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im FAM-Kanal*****Die Real-time-RT-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein***

Überprüfen Sie die Real-time-RT-PCR-Bedingungen (Kapitel 12).

***Real-time-RT-PCR-Inhibition***

Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe Kapitel „Probenvorbereitung“). Beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden (ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei hoher Geschwindigkeit vor der RNA-Elution wird empfohlen).

***Verlust der RNA während des Aufarbeitungsprozesses***

Falls die Kontroll-RNA vor der Extraktion zugefügt wurde, kann das Ausbleiben des Signals auf eine fehlerhafte RNA-Extraktion hinweisen. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden und beachten Sie die Herstellerangaben.

***Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum***

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

**Detektion eines Signals im FAM-Kanal der Negativkontrolle*****Kontamination des Real-time-RT-PCR-Ansatzes***

Wiederholen Sie die Real-time-RT-PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Reaktionsgefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben. Falls die Negativkontrolle in der Wiederholung wieder ein Signal im FAM-Kanal ergibt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kitkomponenten kontaminiert sind. Stellen Sie sicher,

dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die Real-time-RT-PCR mit einem neuen Kit.

## 17 LEISTUNGSDATEN

### 17.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Während der Validierungsstudie des MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR-Kits wurden 32 positive und 98 negative Proben getestet. Der Wert für sowohl diagnostische Spezifität als auch Sensitivität wurde mit 100 % bestimmt.

Sowohl der positive als auch der negative Vorhersagewert liegen bei 100 % (Tabelle 7)

Tabelle 7: Übersicht über getestete Probenanzahl sowie sich daraus ergebende positive und negative Vorhersagewerte.

	Positive Proben	Negative Proben
MutaPLEX® FSME (TBE) positiv	32	0
MutaPLEX® FSME (TBE) negativ	0	98
Sensitivität	100 %	
Spezifität	100 %	

### 17.2 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR-Kits wurde anhand serieller Verdünnungen von K617-FSME-Virus-Zellkulturüberständen ermittelt. Die Ergebnisse der Duplikatsbestimmungen sind in Tabelle 8 gezeigt.

Die Bestimmungsgrenze (LoD) des MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR-Kits beträgt > 0,016 TCID<sub>50</sub> pro Reaktion (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Für die Validierung der Sensitivität des MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR-Kits gemessene Proben

TCID <sub>50</sub> per reaction	CT-value FAM	mean CT FAM
16	27,19	27,37
	27,55	
1,6	30,28	30,25
	30,21	

TCID50 per reaction	CT-value FAM	mean CT FAM
0,16	33,04 32,83	32,94
0,016	36,56 36,51	36,54
0,0016	45,00 40,78	42,89
0,00016	38,09 45,00	42,70

### 17.3 Analytische Spezifität

Die Spezifität des MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR-Kits wurde anhand verschiedener weiterer relevanter Viren und Bakterien aus klinischen Proben bestimmt. Der MutaPLEX® FSME Real-time-RT-PCR-Kit ergab positive Ergebnisse für alle Proben, die FSME-Viren enthielten, alle anderen Proben wurden korrekt als negativ bewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.
















Tabelle 9: Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des MutaPLEX® FSME (TBE) Real-time-RT-PCR-Kits untersuchte bakterielle und virale Pathogene

Stamm	Erwartetes Ergebnis	Ergebnis
Enterovirus 68	negativ	negativ
Coxsackievirus B3	negativ	negativ
Coxsackievirus A16	negativ	negativ
Coxsackievirus B5	negativ	negativ
Influenzavirus A A/ Brisbane H1N1 59/2007 E40/08	negativ	negativ
Influenzavirus A Indonesia H5N1 05/2005	negativ	negativ
Influenzavirus A Panama H3N2 2007/99	negativ	negativ
Influenzavirus B B/ Brisbane 60/2008 E09/09	negativ	negativ
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	negativ	negativ
<i>Ehrlichia ewingii</i>	negativ	negativ

<b>Stamm</b>	<b>Erwartetes Ergebnis</b>	<b>Ergebnis</b>
<i>Ehrlichia canis</i>	negativ	negativ
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	negativ	negativ
<i>Anaplasma platy</i>	negativ	negativ
<i>Babesia divergens</i>	negativ	negativ
<i>Babesia microti</i>	negativ	negativ
<i>Babesia</i> sp. EU1	negativ	negativ
<i>Borrelia burgdorferi</i> Stamm 4681	negativ	negativ
<i>Borrelia afzelii</i>	negativ	negativ
<i>Treponema phagedenis</i>	negativ	negativ
<i>Borrelia miyamotoi</i>	negativ	negativ
<i>Borrelia bavariensis</i>	negativ	negativ
<i>Borrelia garinii</i> OspA Typ 8	negativ	negativ
<i>Borrelia kurtenbachii</i>	negativ	negativ
<i>Coxiella burnetii</i>	negativ	negativ
FSME-Virus	positiv	positiv
West-Nil-Virus	negativ	negativ
Zikavirus MR766	negativ	negativ
Chikungunyavirus S27 Afrika	negativ	negativ
Gelbfiebervirus 17D	negativ	negativ
Denguevirus 1	negativ	negativ
Denguevirus 2	negativ	negativ
Denguevirus 3	negativ	negativ
Denguevirus 4	negativ	negativ



## 18 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

cDNA	komplementäre Desoxyribonuk- leinsäure		Negativkontrolle
CT	Cycle Threshold		Kontroll-RNA
FSME	Frühsommer- meningoenzepha- litis		Zu verwenden mit
PCR	Polymerase- Kettenreaktion		Katalognummer
RNA	Ribonukleinsäure		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
RT	Reverse Transkrip- tion		Obere Temperatur- grenze
	Reaktionsmix		Hersteller
	Enzym		Verwendbar bis
	Positivkontrolle		Chargennummer
TCID50	<i>Tissue Culture In- fective Dose 50 %</i>		Inhalt
	<i>In-vitro-Diagnos- tikum</i>		Arbeitsanleitung beachten

# MutaPLEX<sup>®</sup> FSME (TBE) real time RT-PCR kit

*Test for the in vitro detection of RNA of  
the tick-borne encephalitis virus (TBE)  
extracted from clinical samples and ticks*

Valid from 2018-11-19



**KG1916032**  
**KG1916096**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1</b>	<b>INTENDED USE</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>PATHOGEN INFORMATION</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>PACKAGE CONTENTS</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY</b>	<b>19</b>
<b>7</b>	<b>IMPORTANT NOTES</b>	<b>20</b>
<b>8</b>	<b>GENERAL PRECAUTIONS</b>	<b>20</b>
<b>9</b>	<b>SAMPLE MATERIAL</b>	<b>20</b>
<b>10</b>	<b>SAMPLE PREPARATION</b>	<b>20</b>
<b>11</b>	<b>CONTROL RNA</b>	<b>21</b>
	<i>RNA isolation from clinical samples</i>	<i>21</i>
<b>12</b>	<b>REAL TIME RT-PCR</b>	<b>21</b>
	<i>12.1 Important Points Before Starting</i>	<i>21</i>
	<i>12.2 Procedure</i>	<i>22</i>
	<i>12.3 Instrument settings</i>	<i>23</i>
<b>13</b>	<b>DATA ANALYSIS</b>	<b>24</b>
<b>14</b>	<b>ASSAY VALIDATION</b>	<b>26</b>
<b>15</b>	<b>LIMITATIONS OF THE METHOD</b>	<b>27</b>
<b>16</b>	<b>TROUBLESHOOTING</b>	<b>27</b>
<b>17</b>	<b>KIT PERFORMANCE</b>	<b>28</b>
	<i>17.1 Diagnostic Sensitivity and Specificity</i>	<i>28</i>
	<i>17.2 Analytical Sensitivity</i>	<i>29</i>
	<i>17.3 Analytical Specificity</i>	<i>29</i>
<b>18</b>	<b>ABBREVIATIONS AND SYMBOLS</b>	<b>31</b>

## 1 INTENDED USE

The MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR is an assay for the detection of RNA of TBE virus extracted from clinical specimens or ticks using real time RT-PCR in open real time RT-PCR systems.

## 2 PATHOGEN INFORMATION

Tick-borne encephalitis (TBE) is a disease caused by the tick-borne encephalitis virus. The disease pattern includes flu-like symptoms and fever. TBE most often manifests as meningitis, encephalitis or meningoencephalitis. However, most patients show no symptoms after infection. The disease is transmitted by the sting of an infected tick, mainly *Ixodes ricinus*.

A causative treatment against TBE is not possible. Beside common precautions like scanning the body for ticks, active vaccination is the most effective method for preventing TBE. Vaccination is recommended for all persons in high-risk areas.

Reliable diagnosis can be made on the basis of symptoms, course of disease, anamnesis and serological findings.

To better evaluate the risk of infection after the sting of a tick, the tick can be tested by real time RT-PCR for the presence of TBE virus RNA.

There is no curative therapy for TBE. In severe cases, interferons are administered. All-together, the therapy is restricted to symptomatic measures. Bed rest and dimming of the sick room can help to avoid complications.

## 3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR kit contains specific primers and dual-labelled probes for the amplification and detection of RNA of TBE virus extracted from clinical specimens.

The reverse transcription (RT) of viral RNA to cDNA and the subsequent amplification of TBE virus-specific fragments are performed in an one-step RT-PCR. The amplification can be detected when specific probes are hydrolysed by the polymerase. The presence of nucleic acid is detected by an increase in fluorescence due to hydrolysis of the probes during amplification.

The fluorescence of the pathogen-specific probes is measured in the FAM channel. Furthermore, MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR kit contains a control RNA, which is added during RNA extraction and detected in the same reaction by a differently labelled probe.

The control RNA allows the detection of RT-PCR inhibition and acts as control for the isolation of the nucleic acid from the clinical specimen.

The fluorescence of the control RNA is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

## 4 PACKAGE CONTENTS

The reagents supplied are sufficient for 32 (KG1916032) or 96 (KG1916096) reactions, respectively.

Table 1: Components of the MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR kit.

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Reaction Mix	yellow	1 x 506 µl	2 x 759 µl
Enzyme	blue	1 x 6.4 µl	1 x 19.2 µl
Positive control	red	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Negative control	green	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Control RNA	colourless	1 x 160 µl	2 x 240 µl

## 5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- RNA isolation kit (e.g. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038, or MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1023/KG1024)
- PCR grade water
- Sterile microtubes
- Pipets (adjustable volume)
- Sterile pipet tips with filter
- Table centrifuge
- Vortex mixer
- Real time PCR instrument
- Optical PCR reaction tubes with lid
- Optional: Liquid handling system for automation

## 6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR-Kit is shipped on dry ice or cool packs. All components must be stored at  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  in the dark immediately after receipt. Do not use reagents after the date of expiry printed on the package. Opened reagents can be stored at  $2-8^{\circ}\text{C}$  for up to 6 months.

Up to 20 freeze and thaw cycles are possible. Protect kit components from direct sunlight during the complete test run.

## 7 IMPORTANT NOTES

- The MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR must be performed by qualified personnel only.
- Good Laboratory Practice (GLP) has to be applied.
- Clinical samples must always be regarded as potentially infectious material and all equipment used has to be treated as potentially contaminated.

## 8 GENERAL PRECAUTIONS

- Stick to the protocol described in the instructions for use.
- Set up different laboratory areas for the preparation of samples and for the set up of the RT-PCR in order to avoid contaminations.
- Pipettes, tubes and other materials must not circulate between those different laboratory areas.
- Always use filter tips.
- Regularly decontaminate equipment and benches with ethanol-free decontaminant.
- Do not combine MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR-Kit components of different lot numbers.

## 9 SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR is viral RNA extracted from clinical specimens or ticks.

## 10 SAMPLE PREPARATION

The MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR is suitable for the detection of TBE virus RNA isolated from clinical specimens with appropriate isolation methods.

Commercial kits for RNA isolation such as MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038) are recommended. It is recommended to use mechanical disruption of ticks before RNA extraction. Please follow the instructions for use of the respective extraction kit.

**Important:** In addition to the samples, always run a water control in your extraction. Treat this water control analogous to a sample.

Comparing the amplification of the control RNA in the samples to the amplification of the internal control in the water control will give insights on possible inhibitions of the real time RT-PCR. Furthermore, possible contaminations during RNA extraction will be detectable.

**Please note chapter 11 “Control RNA”.**

If the real time RT-PCR is not performed immediately, store extracted RNA according to the instructions given by the RNA extraction kit’s manufacturer.

## 11 CONTROL RNA

A control RNA is supplied and can be used as extraction control or only as inhibition control. This allows the user to control the RNA isolation procedure and to check for possible real time RT-PCR inhibition.

### *RNA isolation from clinical samples*

#### **a) Control RNA used as extraction control**

MutaPLEX® FSME (TBE) control RNA is added to the RNA extraction.

Add 5 µl control RNA per extraction (5 µl x (N+1)). Mix well. Perform the RNA isolation according to the manufacturer’s instructions. Please follow protocol A.

**The control RNA must be added to the lysis buffer of the extraction kit.**

#### **b) Control RNA used as internal control of the real time RT-PCR**

If only inhibition will be checked, please follow protocol B.

## 12 REAL TIME RT-PCR

### *12.1 Important Points Before Starting*

- Please pay attention to chapter 7 “Important Notes”.
- Before setting up the real time RT-PCR, familiarise yourself with the real time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the RT-PCR set up.

- In every RT-PCR run, one positive control and one negative control should be included.
- Before each use, all reagents should be thawed completely at room temperature, thoroughly mixed, and centrifuged very briefly.
- We recommend to keep reagents and samples at 2–8°C (e.g. on ice or a cooling block) at all times.

## 12.2 Procedure

If the control RNA is used to control both, the real time RT-PCR and the RNA isolation procedure, please follow protocol A. If the control RNA is solely used to detect possible inhibition of the real time RT-PCR, please follow protocol B.

### Protocol A

**The control RNA was added during RNA extraction (see chapter 11 “Control RNA”). In this case, prepare the master mix according to table 2.**

The master mix contains all of the components needed for RT-PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 2: Preparation of the master mix (control RNA was added during RNA extraction)

Volume per reaction	Volume master mix
15.8 µl Reaction Mix	15.8 µl x (N+1)
0.2 µl Enzyme	0.2 µl x (N+1)

### Protocol B

The control RNA is used for the control of the real time RT-PCR only (see chapter 11 “Control RNA”). In this case, prepare the master mix according to table 3.

The master mix contains all of the components needed for real RT-PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

**Important:** Dilute the **control RNA 1:10** in PCR grade water (e.g. 1 µl control RNA + 9 µl PCR grade water) before adding it to the master mix.



Table 3: Preparation of the master mix (control RNA is added directly to the master mix)

Volume per reaction	Volume master mix
15.8 µl Reaction Mix	15.8 µl x (N+1)
0.2 µl Enzyme	0.2 µl x (N+1)
0.2 µl Control RNA* <b>diluted 1:10</b>	0.2 µl x (N+1)*

\*The increase in volume caused by adding the control RNA is not taken into account when preparing the PCR assay. The sensitivity of the detection system is not impaired.

### Protocol A and B: real time RT-PCR set up

- Place the number of optical PCR reaction tubes needed into the respective tray of the real time PCR instrument.
- Pipet 16 µl of the master mix into each optical PCR reaction tube.
- Add 4 µl of the eluates from the RNA isolation (including the eluate of the water control), the positive control and the negative control to the corresponding optical PCR reaction tube (table 4).
- Close the optical PCR reaction tubes immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

Table 4: Preparation of the real time RT-PCR

Component	Volume
Master mix	16.0 µl
Sample	4.0 µl
Total volume	20.0 µl

## 12.3 Instrument settings

For the real time RT-PCR, use the thermal profile shown in table 5.

Table 5: real time RT-PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	No of cycles
Reverse Transcription	20 min	45 °C	1
Initial Denaturation	5 min	95 °C	1
Amplification of DNA			45
Denaturation	10 s	95 °C	
Annealing	20 s	60 °C	
	Acquisition at the end of this step		
Extension	10 s	72 °C	

Dependent on the real time instrument used, further instrument settings have to be adjusted according to table 6.

Table 6: Overview of the instrument settings required for the MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR.

Real time RT-PCR Instrument	Parameter	Detection Channel	Notes	
LightCycler 480I	TBE virus control RNA	483–533 523–568	Color compensation kit needed, e.g. pre-installed universal CC FAM (510) – VIC (580)	
LightCycler 480II	TBE virus control RNA	465–510 533–580		
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	TBE virus control RNA	FAM HEX	Gain 8 Gain 1	Reference Dye: None
ABI 7500	TBE virus control RNA	FAM JOE	Option Reference Dye ROX: NO	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	TBE virus control RNA	Green Yellow	Gain 5 Gain 5	
Mic qPCR Cycler	TBE virus control RNA	Green Yellow	Gain 8 Gain 10	

### 13 DATA ANALYSIS

The TBE virus-specific amplification is measured in the FAM channel. The amplification of the control RNA is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

**The following results can occur:**

- **A signal in the FAM channel is detected:**

**The result is positive, the sample contains TBE virus RNA.**

In this case, detection of a signal of the control RNA in the VIC®/HEX/JOE/TET channel is inessential, as high concentrations of cDNA may reduce or completely inhibit amplification of the control RNA.

- **No signal in the FAM channel, but a signal in the VIC®/HEX/JOE/TET channel is detected:**

**The result is negative, the sample does not contain TBE virus RNA.**

The signal of the control RNA excludes the possibilities of RNA isolation failure (in case the control RNA is being used as an extraction control) and/or real time RT-PCR inhibition. If the CT value of a sample differs significantly from the CT value of the water control, a partial inhibition occurred, which can lead to negative results in weak positive samples (see „Troubleshooting“).

- **Neither in the FAM nor in the VIC®/HEX/JOE/TET channel a signal is detected:**

**A diagnostic statement cannot be made.**

The RNA isolation was not successful or an inhibition of the RT-PCR has occurred. In case the control RNA was added during RNA isolation and not directly to the PCR master mix, the negative control is negative in both channels.

Figure 1 and figure 2 show examples for positive and negative real time RT-PCR results.

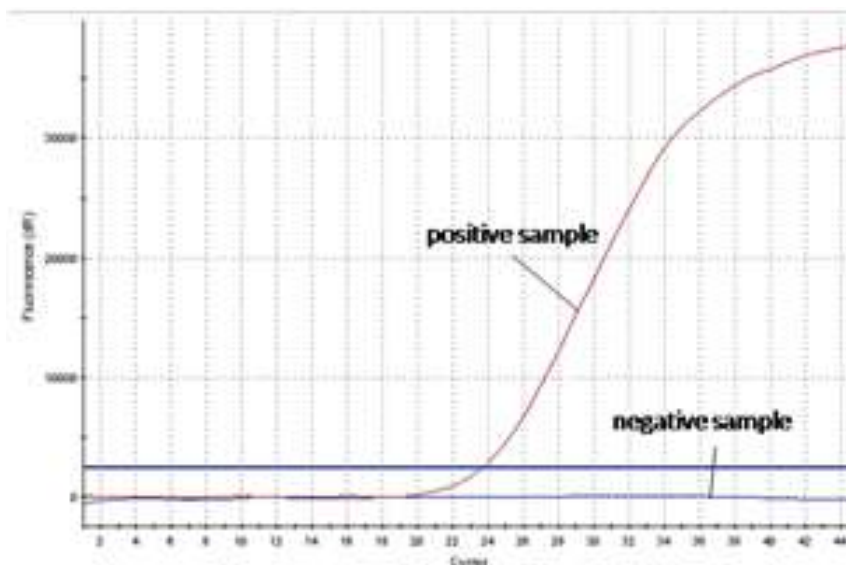


Figure 1: The positive sample shows virus-specific amplification in the FAM channel, whereas no fluorescence signal is detected in the negative sample.

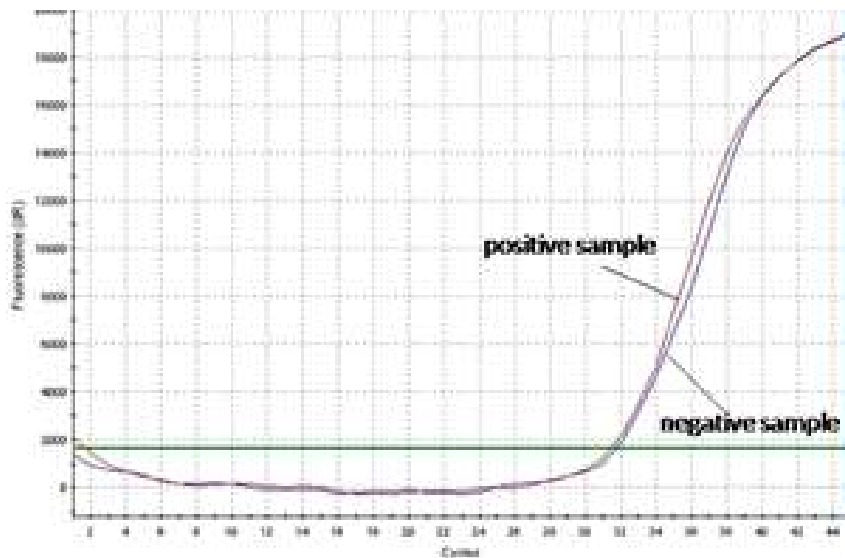


Figure 2: The positive sample as well as the negative sample show a signal in the control RNA-specific VIC®/HEX/JOE/TET channel. The amplification signal of the control RNA in the negative sample shows that the missing signal in the virus-specific FAM channel is not due to RT-PCR inhibition or failure of RNA isolation, but that the sample is a true negative.

## 14 ASSAY VALIDATION

Set a threshold as follows:

### Negative controls

All negative controls should be below the threshold. If there is a potential contamination (appearance of a curve in the negative control or a cluster of curves in specimens at high CT – for example above 36), results obtained are not interpretable and the whole run (including extraction) has to be repeated.

### Positive controls

All the positive controls must show a positive (i.e. exponential) amplification curve. The positive controls must fall below a CT of 30.

### Internal controls

All internal controls must show a positive (i.e. exponential) amplification curve. The internal control must fall below a CT of 33. If the internal control is above CT 34, this points to a purification problem or a strong positive sample that can inhibit the IC. In the latter case, the assay is valid. If a water control run is performed, the IC must fall below a CT of 33.

## 15 LIMITATIONS OF THE METHOD

The results must always be considered in relation to the clinical symptoms. Therapeutical consequences should be made in consideration of clinical data.

A negative test result does not exclude a TBE virus infection.

## 16 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a real time RT-PCR.

### **No fluorescence signal in the FAM channel of the positive control**

#### ***The selected channel for analysis does not comply with the protocol***

Select the FAM channel for analysis of the virus-specific amplification and the VIC®/HEX/JOE/TET channel for the amplification of the control RNA.

#### ***Incorrect configuration of the real time RT-PCR***

Check your work steps and compare with chapter "Procedure".

#### ***The programming of the thermal profile is incorrect***

Compare the thermal profile with the protocol (table 5).

#### ***Incorrect storage conditions for one or more kit components or kit expired***

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter "Transport, Storage and Stability".

### **Weak or no signal of the control RNA and simultaneous absence of a signal in the virus-specific FAM channel**

#### ***real time RT-PCR conditions do not comply with the protocol***

Check the real time RT-PCR conditions (chapter 12).

#### ***real time RT-PCR inhibited***

Make sure that you use an appropriate isolation method (see "Sample preparation") and follow the manufacturer's instructions. Make sure that the ethanol-containing washing buffer of the isolation kit has been completely removed. An additional centrifugation step at high speed is recommended before elution of the RNA.

***RNA loss during isolation process***

In case the control RNA was added before extraction, the lack of an amplification signal can indicate that the RNA isolation was not successful. Make sure that you use an appropriate isolation method (commercial kits are recommended) and stick to the manufacturer's protocol.

***Incorrect storage conditions for one or more components or kit expired***

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter "Transport, Storage and Stability".

**Detection of a fluorescence signal in the FAM channel of the negative control*****Contamination during preparation of the RT-PCR***

Repeat the real time RT-PCR in replicates. If the result is negative in the repetition, the contamination occurred when the samples were pipetted into the optical PCR reaction tubes. Make sure to pipet the positive control last and close the optical PCR reaction tube immediately after adding the sample. If the same result occurs, one or more of the kit components might be contaminated. Make sure that work space and instruments are decontaminated regularly. Use a new kit and repeat the real time RT-PCR.

**17 KIT PERFORMANCE*****17.1 Diagnostic Sensitivity and Specificity***

During the validation study of the MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR kit, 32 positive and 98 negative samples were tested. The diagnostic sensitivity was found to be 100% and the diagnostic specificity 100% (table 7).

The positive predictive value was found to be 100%, the negative predictive value showed to be 100%.

Table 7: Overview of the amount of samples tested and the resulting positive and negative predictive values

	<b>positive samples</b>	<b>negative samples</b>
MutaPLEX® FSME (TBE) positive	32	0
MutaPLEX® FSME (TBE) negative	0	98
Sensitivity	100%	
Specificity	100%	

## 17.2 Analytical Sensitivity

The limit of detection (LoD) of the MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR kit was determined using serial dilutions of a cell culture supernatant containing TBE virus K617 in a Stratagene Mx3000 real time PCR instrument. The results of the determinations in duplicates are shown in table 8.

The LoD of the MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR kit is >0.016 TCID50 per reaction each.

Table 8: Samples tested for the validation of the sensitivity of the virellaTBE real time RT-PCR Kit LC.

TCID50 per reaction	CT-value FAM	mean CT FAM
16	27.19 27.55	27.37
1.6	30.28 30.21	30.25
0.16	33.04 32.83	32.94
0.016	36.56 36.51	36.54
0.0016	45.00 40.78	42.89
0.00016	38.09 45.00	42.70

## 17.3 Analytical Specificity

The specificity of MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR was evaluated by *in silico* analysis and additionally by amplification of RNA and DNA of other relevant viruses and bacteria found in clinical samples. The MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR showed a positive result for the samples containing TBE virus, whereas samples containing other pathogens were reliably tested negative. The results are shown in table 9.

Table 9: Bacterial and viral pathogens tested for the determination of the analytical specificity of MutaPLEX® FSME (TBE) real time RT-PCR.









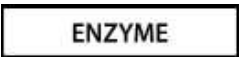






Strain	Expected Result	Result
Enterovirus 68	negative	negative

Strain	Expected Result	Result
Coxsackievirus B3	negative	negative
Coxsackievirus A16	negative	negative
Coxsackievirus B5	negative	negative
Influenza virus A A/ Brisbane H1N1 59/2007 E40/08	negative	negative
Influenza virus A Indonesia H5N1 05/2005	negative	negative
Influenza virus A Panama H3N2 2007/99	negative	negative
Influenza virus B B/ Brisbane 60/2008 E09/09	negative	negative
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	negative	negative
<i>Ehrlichia ewingii</i>	negative	negative
<i>Ehrlichia canis</i>	negative	negative
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	negative	negative
<i>Anaplasma platy</i>	negative	negative
<i>Babesia divergens</i>	negative	negative
<i>Babesia microti</i>	negative	negative
<i>Babesia</i> sp. EU1	negative	negative
<i>Borrelia burgdorferi</i> strain 4681	negative	negative
<i>Borrelia afzelii</i>	negative	negative
<i>Treponema phagedenis</i>	negative	negative
<i>Borrelia miyamotoi</i>	negative	negative
<i>Borrelia bavariensis</i>	negative	negative
<i>Borrelia garinii</i> OspA type 8	negative	negative
<i>Borrelia kurtenbachii</i>	negative	negative
<i>Coxiella burnetii</i>	negative	negative
TBE virus	positive	positive
West Nile virus	negative	negative
Zika virus MR766	negative	negative
Chikungunya virus S27 Afrika	negative	negative



Strain	Expected Result	Result
Yellow fever virus 17D	negative	negative
Dengue virus 1	negative	negative
Dengue virus 2	negative	negative
Dengue virus 3	negative	negative
Dengue virus 4	negative	negative

## 18 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

cDNA	complementary Deoxyribonucleid Acid		Negative control
CT	Cycle Threshold		Control RNA
TBE	Tick-born encephalitis		To be used with
PCR	Polymerase Chain Reaction		Catalog number
RNA	Ribonucleid Acid		Contains sufficient for <n> test
RT	Reverse Transcription		Upper limit of temperature
	Reaction Mix		Manufacturer
	Enzyme		Use by
	Positive control		Lot number
	In vitro diagnostic medical device		Content
TCID50	Tissue Culture Infective Dose 50 %		Consult instructions for use

## **Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

[info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

