

# MutaPLEX® RespiraSys 1

## real time RT-PCR kit

***Test für den in-vitro-Nachweis der RNA von Influenza-A- und Influenza-B-Viren und des Respiratorischen Synzytial-Virus aus biologischen Proben***

***Test for the in vitro detection of the RNA of Influenza A virus, Influenza B virus and Respiratory Syncytial Virus extracted from biological specimens***

Gültig ab / Valid from 2021-11-03

**REF** **KG198432**  
**KG198496**

$\Sigma$   
32/96

$-20^{\circ}\text{C}$   


**IVD** **CE**



**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>2</b>
<b>7</b>	<b>WICHTIGE HINWEISE</b>	<b>3</b>
<b>8</b>	<b>PROBENMATERIAL</b>	<b>4</b>
<b>9</b>	<b>PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<b>10</b>	<b>KONTROLL-RNA</b>	<b>5</b>
<b>11</b>	<b>REAL TIME RT-PCR</b>	<b>5</b>
	11.1 <i>Wichtige Punkte vor dem Start:</i>	5
	11.2 <i>Durchführung</i>	5
	11.3 <i>Geräteeinstellungen</i>	6
<b>12</b>	<b>INTERPRETATION DER ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>13</b>	<b>VALIDIERUNGSDATEN</b>	<b>10</b>
<b>14</b>	<b>EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>10</b>
<b>15</b>	<b>PROBLEMBEHANDLUNG</b>	<b>11</b>
<b>16</b>	<b>LEISTUNGSDATEN</b>	<b>13</b>
	16.1 <i>Analytische Sensitivität</i>	13
	16.2 <i>Analytische Spezifität</i>	13
	16.3 <i>Linearer Bereich</i>	22
	16.4 <i>Präzision</i>	23
	16.5 <i>Diagnostische Sensitivität</i>	24
<b>17</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b>	<b>25</b>
<b>18</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>25</b>

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Das MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR-Kit ist ein Assay zum gleichzeitigen Nachweis von RNA des Influenza A Virus, Influenza B Virus und Respiratorisches Synzytial-Virus (RSV) aus biologischen Proben.

## 2 EINLEITUNG

Influenzaviren gehören zur Familie der Orthomyxoviridae und sind der Erreger der „echten Grippe“. Influenza A- und B-Viren haben ein einzelsträngiges RNA-Genom, das aus 8 RNA-Segmenten besteht. Das Genom der Influenza-A-Viren ist durch eine hohe Mutationshäufigkeit, den so genannten „Antigen Drift“, gekennzeichnet. Es sind zahlreiche Subtypen von Influenza-A-Viren bekannt. Sie lassen sich anhand ihrer Oberflächenantigene H (Hämagglutinin) und N (Neuraminidase) kategorisieren. Daher werden jährlich *in-silico*-Analysen der Sequenzen neu aufgetretener Subtypen durchgeführt, um falsch negative Ergebnisse aufgrund von Primer- und/oder Fehlanpassungen zu vermeiden.

Respiratorische Synzytialviren (RSV) sind umhüllte RNA-Viren mit einzelsträngiger Minus-RNA. RSV gehören in die Familie der Paramyxoviridae, zur Unterfamilie der Pneumovirinae und werden in die Subtypen A und B eingeteilt. RSV ist ein Virus, das über Tröpfcheninfektion die oberen Atemwege, die Bronchien und die Lunge infiziert. Das RSV ist ein weltweit verbreiteter Erreger, sodass die meisten Kinder im Alter von 2 Jahren schon einmal mit dem Virus infiziert waren. Bei Erwachsenen und gesunden Kindern ähnelt die Symptomatik einer RSV-Infektionen der Influenza. Die Infektion ist üblicherweise selbstlimitierend und die geschädigten Epithelien regenerieren innerhalb von 4–8 Wochen. Komplikationen einer RSV-Infektion treten insbesondere bei Risikopatienten (Frühgeborene, Kinder mit Grunderkrankungen oder immungeschwächte Erwachsenen bzw. Erwachsenen mit Herz- und Lungenkrankheiten) auf.

## 3 TESTPRINZIP

Der MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR-Kit enthält spezifische Primer und zweifach markierte Sonden für die Amplifikation der RNA (cDNA) von Influenza A Virus (M-Gen, FAM-Kanal), RSV (M-Gen, ROX-Kanal) und Influenza B Virus (NEP-Gen, Cy5-Kanal), die aus biologischen Proben extrahiert wurden. Darüber hinaus enthält der MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR-Kit eine Kontroll-RNA (Internal Process Control, IPC), die während der RNA-Extraktion zugegeben und in der gleichen Reaktion durch eine HEX-markierte Sonde nachgewiesen wird. Die Kontroll-RNA ermöglicht den Nachweis von RT-PCR-Inhibition und dient als Kontrolle, dass die Nukleinsäure aus der biologischen Probe isoliert wurde.

## 4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 32 (KG198432) bzw. 96 (KG198496) Nachweisreaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR-Kits

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Reaction Mix	gelb	1 x 442 µl	1 x 1325 µl
Enzyme	blau	1 x 6,4 µl	1 x 19,2 µl
Positive Control <i>Influenza A, Influenza B, RSV</i>	rot	1 x 50 µl	1 x 150 µl
Negative Control	grün	1 x 50 µl	1 x 150 µl
Control RNA	transparent	1 x 160 µl	1 x 480 µl

## 5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- RNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1024)
- Reinstwasser\*
- Sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortex-Wirbelmischer
- Real-time-PCR-Gerät
- optische PCR-Gefäße mit Deckel oder optische 96-Well-Platte mit optischer Folie
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

\* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

## 6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR-Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei maximal -20 °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°C gelagert werden. Bis zu 20 Frier-Auftau-Zyklen sind möglich. Schützen Sie den Test während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

## 7 WICHTIGE HINWEISE

Lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt verwenden. Überprüfen Sie vor dem ersten Gebrauch das Produkt und seine Bestandteile auf den ordnungsgemäßen Zustand.

- Die Richtlinien der *Good Laboratory Practice* (GLP) sind einzuhalten.
- Die MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Der Arbeitsablauf im Labor sollte unidirektional ablaufen. Verwenden Sie voneinander getrennte Arbeitsbereiche für:
  1. die Probenvorbereitung
  2. den Reaktionsaufbau
  3. die Amplifikations-/Detektionsaktivitäten.
- Tragen Sie in jedem Bereich Einweghandschuhe und wechseln Sie diese, bevor Sie einen anderen Bereich betreten.
- Material und Ausrüstung den einzelnen Arbeitsbereichen zuordnen und nicht von einem Bereich in einen anderen verlagern.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.
- Lagern Sie positives oder potenziell positives Material getrennt von allen anderen Komponenten des Kits.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Eine mikrobielle und Nuklease-Kontamination (DNase/RNase) der Eluate sowie aller Kit-Komponenten ist unbedingt zu vermeiden.
- Öffnen Sie die Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht, um eine Kontamination mit Amplikonen zu vermeiden.

- Tragen Sie beim Umgang mit den Kitkomponenten stets puderfreie Einweghandschuhe.
- Zusätzliche Kontrollen können gemäß den Richtlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher Vorschriften oder akkreditierter Organisationen mitgeteilt werden.
- Reaktionsgefäße nach der PCR nicht autoklavieren, da dies die amplifizierte Nukleinsäure nicht abbaut und das Risiko einer Kontamination des Laborbereichs birgt.
- Entsorgen Sie Proben- und Testabfälle gemäß den örtlichen Sicherheitsvorschriften.
- Kombinieren Sie keine MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR Komponenten unterschiedlicher Chargennummern.

## 8 PROBENMATERIAL

Ausgangsmaterial für die MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR ist RNA, die aus biologischen Proben (Atemwegsproben) isoliert wird.

## 9 PROBENVORBEREITUNG

Für die RNA-Isolierung werden kommerzielle Kits wie z.B. MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, Immundiagnostik AG, Kat. Nr. KG1024 empfohlen. Bitte beachten Sie die Gebrauchsanweisung des jeweilig verwendeten Extraktionskit.

**Wichtig:** Führen Sie zusätzlich zu den zu analysierenden Proben immer auch eine „Wasserkontrolle“ in Ihrer Extraktion durch. Behandeln Sie diese Wasserkontrolle analog zu einer Probe.

Der Vergleich der Amplifikation der Kontroll-RNA in den Proben mit der Amplifikation der internen Kontrolle in der Wasserkontrolle gibt Aufschluss über mögliche Inhibierungen der Real-Time-RT-PCR. Darüber hinaus können mögliche Kontaminationen während der RNA-Extraktion erkannt werden.

**Bitte beachten Sie das Kapitel 10 „Kontroll-RNA“.**

Wenn die Real-time-RT-PCR nicht sofort durchgeführt wird, lagern Sie die extrahierte RNA gemäß den Anweisungen des Herstellers.

## 10 KONTROLL-RNA

Der MutaPLEX® RespiraSys 1 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

5 µl Kontroll-RNA pro Extraktion zugeben ( $5 \mu\text{l} \times (N+1)$ ). Gut mischen. Führen Sie die RNA-Isolierung gemäß den Anweisungen des Herstellers durch.

**Die Kontroll-RNA muss dem Lysepuffer des Extraktionskits zugesetzt werden.**

## 11 REAL TIME RT-PCR

### 11.1 Wichtige Punkte vor dem Start:

- Bitte beachten Sie das Kapitel 7 „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“.
- Machen Sie sich vor dem Ansetzen der Real-time-RT-PCR mit dem PCR-Gerät vertraut und lesen Sie das entsprechende Benutzerhandbuch.
- Die Programmierung des Temperaturprofil sollte **vor** dem RT-PCR-Setup erfolgen.
- In jedem RT-PCR-Lauf sollte eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten sein.
- Vor jeder Verwendung sollten alle Reagenzien bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut, gründlich gemischt (mit Ausnahme des Enzyms) und sehr kurz zentrifugiert werden.
- Aufgrund der hohen Viskosität des Enzyms (blauer Deckel) wird ein Vorwärmen bei Raumtemperatur für 15 min empfohlen.

### 11.2 Durchführung

Der Mastermix enthält alle für die RT-PCR benötigten Komponenten außer der Probe selbst. Bereiten Sie ein Volumen des Master-Mix für mindestens eine Probe mehr als erforderlich vor, um Ungenauigkeiten beim Pipettieren auszugleichen.

Tabelle 2: Herstellung des Master-Mix

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
13,8 µl Reaction Mix	$13,8 \mu\text{l} \times (N+1)$
0,2 µl Enzyme	$0,2 \mu\text{l} \times (N+1)$

### Real time RT-PCR set-up

- Setzen Sie die benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße (oder die optische 96-Well-PCR-Platte) in den entsprechende Halter des Real-time-PCR-Geräts. / Nehmen Sie eine optische PCR Reaktionsplatte.



- Pipettieren Sie **14 µl** des Master-Mixes in jedes optische PCR-Reaktionsgefäß / die optische 96-Well-PCR-Platte.
- Geben Sie **6 µl** der Eluate aus der RNA-Isolierung (einschließlich des Eluats der Wasserkontrolle), der Positivkontrolle und der Negativkontrolle in das entsprechende optische PCR-Reaktionsgefäß / die optische 96-Well-PCR-Platte (Tabelle 3).
- Verschließen Sie die optischen PCR-Reaktionsgefäße / die optische 96-Well-PCR-Platte sofort nach dem Befüllen, um das Risiko einer Kontamination zu verringern.

Tabelle 3: Ansetzen der Real-time-RT-PCR

Komponente	Volumen
Master-Mix	14,0 µl
Probe	6,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

### 11.3 Geräteeinstellungen

Für die Real-time-RT-PCR ist das in Tabelle 4 beschriebene Temperaturprofil zu benutzen.

Tabelle 4: Real-time-RT-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Reverse Transkription	10 min	45 °C	1
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1
cDNA-Amplifikation			45 Messung am Ende dieses Schrittes
Denaturierung	10 s	95 °C	
Annealing und Verlängerung	40 s	60 °C	

Abhängig vom verwendeten Real-time-Gerät müssen noch weitere, in Tabelle 5 aufgelistete Einstellungen, vorgenommen werden.

Tabelle 5: Überblick über die für die MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR benötigten Geräteeinstellungen

Real-time-PCR-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen		
LightCycler 480II			Farbkompensationskit MutaPLEX® CC CoV-2 (KG19-4-CC) benötigt*		
			Melt factor	Quant factor	Max integration Time [sek]
	Influenza A Virus	465–510	1	10	1
	Kontrol RNA (IPC)	533–580	1	10	2
	RSV	533–610	1	10	2
Influenza B Virus	618–660	1	10	3	
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	Influenza A Virus	FAM	Gain 8	Reference Dye: None	
	Kontrol RNA (IPC)	HEX	Gain 1		
	RSV	ROX	Gain 1		
	Influenza B Virus	Cy5	Gain 4		
AriaMx QuantStudio 5 Bio-Rad CFX96 Bio-Rad CFX Opus 96	Influenza A Virus	FAM	Reference Dye: None		
	Kontrol RNA (IPC)	HEX			
	RSV	ROX			
	Influenza B Virus	Cy5			
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	Influenza A Virus	Green	Gain 5	Outlier Removal NTC Threshold 15%	
	Kontrol RNA (IPC)	Yellow	Gain 5		
	RSV	Orange	Gain 5		
	Influenza B Virus	Red	Gain 5		
Mic qPCR Cycler	Influenza A Virus	Green	Gain 8		
	Kontrol RNA (IPC)	Yellow	Gain 10		
	RSV	Orange	Gain 10		
	Influenza B Virus	Red	Gain 10		

\* kann auf Anfrage bei Immundiagnostik bestellt werden

## 12 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Folgende Ergebnisse können auftreten:

Signal/C <sub>t</sub> Values				Interpretation
FAM Channel Influenza A Virus	Cy5 Channel Influenza B Virus	ROX Channel RSV	HEX Channel Control RNA (IPC)	
<b>positiv</b>	negativ	negativ	positiv oder negativ <sup>1</sup>	<b>Positives Ergebnis, die Probe enthält Influenza A Virus RNA.</b>
negativ	<b>positiv</b>	negativ	positiv oder negativ <sup>1</sup>	<b>Positives Ergebnis, die Probe enthält Influenza B Virus RNA.</b>
negativ	negativ	<b>positiv</b>	positiv oder negativ <sup>1</sup>	<b>Positives Ergebnis, die Probe enthält Respiratory Syncytial Virus RNA.</b>
negativ	negativ	negativ	≤ 34 <sup>2</sup>	<b>Negatives Ergebnis, die Probe enthält weder Influenza A Virus, Influenza B Virus noch Respiratory Syncytial Virus RNA.</b>
negativ	negativ	negativ	negativ oder > 34 <sup>2</sup>	<b>Vorsicht!</b> Die real-time-RT-PCR ist beeinträchtigt oder es sind Fehler bei der RNA/DNA-Extraktion aufgetreten.

<sup>1</sup> Ein starkes positives Signal im FAM-, Cy5- oder ROX-Kanal kann die IPC hemmen. In solchen Fällen kann das Ergebnis für die Kontroll-RNA vernachlässigt werden.

<sup>2</sup> Bei hohen C<sub>t</sub>-Werten sollte die IPC mit der Kontrolle der Wasserextraktion verglichen werden, wie in Kapitel 13 „Validierungsdaten“ beschrieben.

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

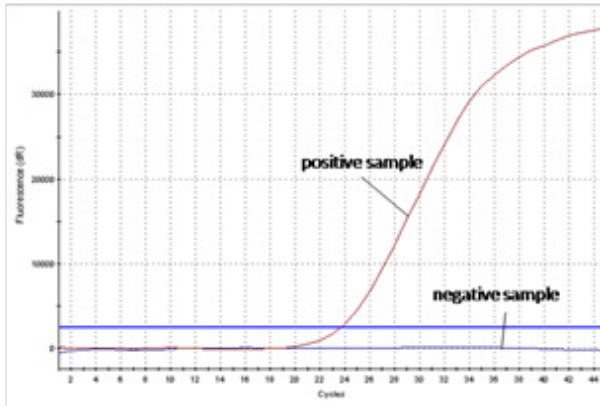


Abb. 1: Die positive Probe zeigt eine virusspezifische Amplifikation im FAM-Kanal, während in der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal zu erkennen ist.

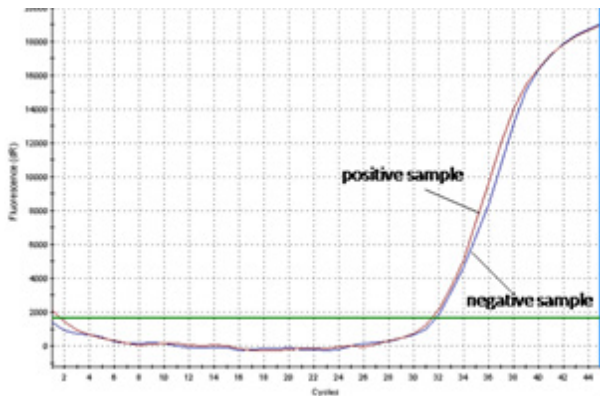


Abb. 2: Die positive Probe und die negative Probe zeigen ein Signal im HEX-Kanal der Kontroll-RNA (IPC). Das Amplifikationssignal der Kontroll-RNA in der negativen Probe zeigt, dass die fehlenden Signale in den pathogenspezifischen Kanälen FAM, Cy5 und ROX nicht auf eine RT-PCR-Inhibition oder eine fehlgeschlagene RNA-Isolierung zurückzuführen sind, sondern dass es sich bei der Probe um eine echte negative Probe handelt.

## 13 VALIDIERUNGSDATEN

### Negativkontrollen

Die Negativkontrolle darf kein  $C_T$  im FAM-, Cy5-, ROX- und HEX-Kanal aufweisen.

### Positivkontrollen

Die Positivkontrolle muss eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve in den verschiedenen Kanälen FAM, Cy5 und ROX aufweisen. Die Positivkontrolle muss unter einen  $C_T$ -Wert von 30 fallen.

### Interne Kontrollen

Die folgenden Werte für die Amplifikation der internen Kontrolle gelten für die Verwendung des Immundiagnostik AG Nukleinsäure-Extraktionskits MutaCLEAN® Mag RNA/DNA. Die Kontroll-RNA (IPC) muss eine positive (d. h. exponentielle) Amplifikationskurve aufweisen. Die Kontroll-RNA muss unter einen  $C_T$  von 34 fallen. Liegt die Kontroll-RNA über einem  $C_T$  von 34, deutet dies auf ein Problem beim Aufreinigen oder eine stark positive Probe hin, dadurch kann die IPC gehemmt sein. In letzterem Fall ist der Assay gültig. Es wird empfohlen, in jedem Lauf die Extraktion einer Wasserkontrolle durchzuführen. Die IPC in der Wasserkontrolle muss unter eine  $C_T$  von 34 fallen.

Wenn andere Nukleinsäureextraktionskits verwendet werden, muss der Kunde eigene „Cutoffs“ festlegen. In diesem Fall sollte der  $C_T$ -Wert der Kontroll-RNA (IPC) in einem Eluat aus einer Probe im Vergleich zu einem Eluat aus einer extrahierten Wasserkontrolle nicht um mehr als 4  $C_T$  verschoben sein.

## 14 EINSCHRÄNKUNGEN

- Um optimale Ergebnisse zu erzielen, ist die strikte Einhaltung der Gebrauchsanweisung erforderlich.
- Die Verwendung dieses Produkts ist auf Personal beschränkt, das speziell in den Techniken der Echtzeit-PCR und der *in-vitro*-Diagnoseverfahren geschult und ausgebildet ist.
- Gute Laborpraxis (GLP) ist für die ordnungsgemäße Durchführung dieses Assays unerlässlich.
- Alle Reagenzien sollten sorgfältig auf Verunreinigungen und Kontaminationen überwacht werden. Alle verdächtigen Reagenzien sollten verworfen werden.
- Dieser Assay darf nicht direkt an einer biologischen Probe durchgeführt werden. Vor der Verwendung dieses Assays müssen geeignete Nukleinsäureextraktionsverfahren durchgeführt werden.

- Das Vorhandensein von RT-PCR-Inhibitoren kann zu falsch negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
- Wie bei jedem diagnostischen Test müssen die Ergebnisse des MutaPLEX® RespiSys 1 Real-time-RT-PCR-Kits unter Einbezug aller Ergebnisse aus Klinik und Labor interpretiert werden.

## 15 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 die Immundiagnostik AG.

### **Kein Fluoreszenzsignal im FAM-, ROX- und Cy5-Kanal der Positivkontrolle**

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

Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der Influenza-A-Virus-spezifischen Amplifikation, den ROX-Kanal für die Analyse der RSV-spezifischen Amplifikation und den Cy5-Kanal für die Analyse der Influenza-B-Virus-spezifischen Amplifikation.

Wählen Sie den HEX-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-RNA.

#### ***Fehlerhaftes Ansetzen des Master-Mix***

Vergewissern Sie sich, dass das Enzym dem Mastermix zugesetzt ist (Kapitel 11 „Real-time-RT-PCR“).

#### ***Fehlerhafte Konfiguration der Real-time-RT-PCR***

Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den im Kapitel 11.2 „Durchführung“ beschriebenen Schritten.

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

Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll in Kapitel 11.3 „Geräteeinstellungen“.

#### ***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 6 „Transport und Lagerung“ beschrieben.

## **Schwaches oder kein Signal der Kontroll-RNA und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im virusspezifischen FAM-/ROX-/Cy5-Kanal**

### ***Die Real-time-RT-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein***

Überprüfen Sie die Real-time-RT-PCR-Bedingungen (Kapitel 11 „Real-time-RT-PCR“).

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

Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe Kapitel 9 „Probenvorbereitung“) und die Angaben des Herstellers befolgen. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden (ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei hoher Geschwindigkeit vor der RNA-Elution wird empfohlen).

### ***Keine ausreichende Menge an Probenmaterial***

Vergewissern Sie sich, dass genügend Probenmaterial für die Extraktion aufgetragen wurde. Verwenden Sie eine geeignete Isolierungsmethode (Kapitel 9 „Probenvorbereitung“) und befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers.

### ***RNA-Verlust während des Isolierungsprozesses***

Wurde die Kontroll-RNA vor der Extraktion hinzugefügt, kann das Fehlen eines Amplifikationssignals darauf hinweisen, dass die RNA-Isolierung nicht erfolgreich war. Vergewissern Sie sich, dass Sie eine geeignete Isolierungsmethode verwenden (es werden kommerzielle Kits empfohlen) und befolgen Sie das Protokoll des Herstellers.

### ***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 6 „Transport und Lagerung“ beschrieben.

## **Detektion eines Fluoreszenzsignals im FAM- und/oder ROX- und/oder Cy5-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 ist die Kontamination beim Pipettieren der Proben in die Reaktionsgefäße aufgetreten. Achten Sie darauf, dass die Positivkontrolle zuletzt pipettiert wird und verschließen Sie die Reaktionsgefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben.

Falls die Negativkontrolle in der Wiederholung wieder ein Signal im FAM-/ROX-/Cy5-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.

## 16 LEISTUNGSDATEN

### 16.1 Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze (LoD) des MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR-Kits wurde mit seriellen Verdünnungen von synthetischen RNA-Fragmenten, die die spezifische Gen-Zielsequenz enthalten, auf einem Stratagene Mx3005P Real-time-PCR Instrument bestimmt.

Der LoD des MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR-Kits für Influenza A Virus beträgt  $< 2,5$  Genomkopien pro  $\mu\text{l}$ , für Respiratory Syncytial Virus  $< 0,25$  Genomkopien pro  $\mu\text{l}$  und für Influenza B Virus  $< 0,125$  Genomkopien pro  $\mu\text{l}$ .

Die Sensitivität des MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR-Kits wurde auch durch Testen von Ringversuchen mit bekanntem Status analysiert.

### 16.2 Analytische Spezifität

Die Spezifität des MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time-RT-PCR-Kits wurde mit verschiedenen Ringversuchsproben mit bekanntem Status und verschiedenen anderen relevanten Viren und Bakterien, die in klinischen Proben gefunden wurden, und auf der Grundlage von *in-silico*-Analysen bewertet.

Alle Ringversuchsproben wurden korrekt erkannt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6, Tabelle 7 und Tabelle 8 dargestellt.

Die Ergebnisse für die Probenanalyse sind in Tabelle 9, Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt. Die Ergebnisse der *in-silico*-Analyse sind in Tabelle 12 aufgeführt.



Tabelle 6: Ringversuchsproben, die zur Validierung der Empfindlichkeit des MutaPLEX® RespiSys 1 Real-time-RT-PCR-Kit getestet wurden. Ergebnisse für Influenza A Virus, FAM-Kanal

<b>Ringversuch Proben mit bekanntem Status</b>	<b>Ringversuch</b>	<b>Erwartetes Ergebnis Influenza A Virus FAM Kanal</b>	<b>MutaPLEX® RespiSys 1 Influenza A Virus FAM Kanal</b>
RESPIplus21S-01	QCMD 2021: Respiratory I Plus RESPIplus-21S	negativ	negativ
RESPIplus21S-02		negativ	negativ
RESPIplus21S-03		<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
RESPIplus21S-04		negativ	negativ
RESPIplus21S-05		negativ	negativ
RESPIplus21S-06		<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
RESPIplus21S-07		<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
RESPIplus21S-08		negativ	negativ
RESPIplus21S-09		negativ	negativ
RESPIplus21S-10		negativ	negativ
432017	Instand: Juni 2021: Respiratory Virus- panel 2 for Multiplex Tests	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
432018		<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
432019		negativ	negativ
432020		negativ	negativ
431017	Instand: Juni 2021: Respiratory Virus- panel 1 for Multiplex Tests	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
431018		negativ	negativ
431019		negativ	negativ
431020		negativ	negativ

Tabelle 7: Ringversuchsproben, die zur Validierung der Empfindlichkeit des MutaPLEX® RespiSys 1 Real-time-RT-PCR-Kits getestet wurden. Ergebnisse für Influenza B Virus, Cy5 Kanal.

Ringversuch Proben mit bekanntem Status	Ringversuch	Erwartetes Ergebnis Influenza B Virus Cy5 Kanal	MutaPLEX® RespiSys 1 Influenza B Virus Cy5 Kanal
RESPIplus21S-01	QCMD 2021: Respiratory I Plus RESPIplus-21S	negativ	negativ
RESPIplus21S-02		<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
RESPIplus21S-03		negativ	negativ
RESPIplus21S-04		negativ	negativ
RESPIplus21S-05		negativ	negativ
RESPIplus21S-06		negativ	negativ
RESPIplus21S-07		negativ	negativ
RESPIplus21S-08		negativ	negativ
RESPIplus21S-09		<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
RESPIplus21S-10		negativ	negativ
432017	Instand: Juni 2021: Respiratory Virus- panel 2 for Multiplex Tests	negativ	negativ
432018		negativ	negativ
432019		<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
432020		negativ	negativ
431017	Instand: Juni 2021: Respiratory Viruspanel 1 for Multiplex Tests	negativ	negativ
431018		<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
431019		negativ	negativ
431020		negativ	negativ

Tabelle 8: Ringversuchsproben, die zur Validierung der Empfindlichkeit des MutaPLEX® RespiSys 1 Real-time-RT-PCR-Kits getestet wurden. Ergebnisse für Respiratory Synzytial Virus, ROX Kanal.

<b>Ringversuch Proben mit bekanntem Status</b>	<b>Ringversuch</b>	<b>Erwartetes Ergebnis RSV ROX Kanal</b>	<b>MutaPLEX® RespiSys 1 RSV ROX Kanal</b>
RESPIplus21S-01	QCMD 2021: Respiratory I Plus RESPIplus-21S	negativ	negativ
RESPIplus21S-02		negativ	negativ
RESPIplus21S-03		negativ	negativ
RESPIplus21S-04		<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
RESPIplus21S-05		negativ	negativ
RESPIplus21S-06		negativ	negativ
RESPIplus21S-07		negativ	negativ
RESPIplus21S-08		negativ	negativ
RESPIplus21S-09		negativ	negativ
RESPIplus21S-10		<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
432017	Instand: Juni 2021: Respiratory Virus- panel 2 for Multiplex Tests	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
432018		negativ	negativ
432019		<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
432020		negativ	negativ
431017	Instand: Juni 2021: Respiratory Virus- panel 1 for Multiplex Tests	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
431018		negativ	negativ
431019		negativ	negativ
431020		negativ	negativ

Tabelle 9: Eluierte RNA/DNA von bakteriellen und viralen Krankheitserregern, die zur Bestimmung der analytischen Spezifität des MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time RT-PCR Kits getestet. FAM-Kanal (Influenza A Virus).

Probe	Erwartetes Ergebnis	MutaPLEX® RespiraSys 1
	Influenza A Virus FAM Kanal	Influenza A Virus FAM Kanal
Adenovirus C2	negativ	negativ
Adenovirus 41	negativ	negativ
Bordetella parapertussis	negativ	negativ
Bordetella pertussis	negativ	negativ
Cytomegalievirus	negativ	negativ
Enterovirus Coxsackie B3	negativ	negativ
Emterovirus D68	negativ	negativ
Epstein-Barr Virus	negativ	negativ
Coronavirus OC43	negativ	negativ
Coronavirus NL63	negativ	negativ
Human Herpesvirus 6	negativ	negativ
Influenza Virus A H1N1	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
Influenza Virus A H3N2	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
Influenza Virus A H5N1	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
Influenza Virus B	negativ	negativ
Human Coronavirus MERS-CoV	negativ	negativ
Metapneumovirus Type A1	negativ	negativ
Metapneumovirus Type A2	negativ	negativ
Staphylococcus aureus (MRSA)	negativ	negativ
Mycobacterium tuberculosis complex	negativ	negativ
Mycoplasma pneumoniae	negativ	negativ
Parainfluenza Type 1	negativ	negativ
Parainfluenza Type 2	negativ	negativ

<b>Probe</b>	<b>Erwartetes Ergebnis Influenza A Virus FAM Kanal</b>	<b>MutaPLEX® RespiraSys 1 Influenza A Virus FAM Kanal</b>
Parainfluenza Type 3	negativ	negativ
Parainfluenza Type 4	negativ	negativ
Parechovirus 3	negativ	negativ
Pneumocystis jirovecii	negativ	negativ
Respiratory Syncytial Virus A	negativ	negativ
Respiratory Syncytial Virus B	negativ	negativ
Rhinovirus Type 5	negativ	negativ
Rotavirus G1 [P8]	negativ	negativ
SARS-CoV-2	negativ	negativ

Tabelle 10: Eluierte RNA/DNA von bakteriellen und viralen Krankheitserregern, die zur Bestimmung der analytischen Spezifität des MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time RT-PCR Kits getestet. Cy5-Kanal (Influenza-B-Virus).

<b>Probe</b>	<b>Erwartetes Ergebnis Influenza B Virus Cy5 Kanal</b>	<b>MutaPLEX® RespiraSys 1 Influenza B Virus Cy5 Kanal</b>
Adenovirus C2	negativ	negativ
Adenovirus 41	negativ	negativ
Bordetella parapertussis	negativ	negativ
Bordetella pertussis	negativ	negativ
Cytomegalievirus	negativ	negativ
Enterovirus Coxsackie B3	negativ	negativ
Enterovirus D68	negativ	negativ
Epstein-Barr Virus	negativ	negativ
Coronavirus OC43	negativ	negativ
Coronavirus NL63	negativ	negativ
Human Herpesvirus 6	negativ	negativ
Influenza Virus A H1N1	negativ	negativ
Influenza Virus A H3N2	negativ	negativ
Influenza Virus A H5N1	negativ	negativ

<b>Probe</b>	<b>Erwartetes Ergebnis Influenza B Virus Cy5 Kanal</b>	<b>MutaPLEX® RespiraSys 1 Influenza B Virus Cy5 Kanal</b>
Influenza Virus B	positiv	positiv
Human Coronavirus MERS-CoV	negativ	negativ
Metapneumovirus Type A1	negativ	negativ
Metapneumovirus Type A2	negativ	negativ
Staphylococcus aureus (MRSA)	negativ	negativ
Mycobacterium tuberculosis complex	negativ	negativ
Mycoplasma pneumoniae	negativ	negativ
Parainfluenza Type 1	negativ	negativ
Parainfluenza Type 2	negativ	negativ
Parainfluenza Type 3	negativ	negativ
Parainfluenza Type 4	negativ	negativ
Parechovirus 3	negativ	negativ
Pneumocystis jirovecii	negativ	negativ
Respiratory Syncytial Virus A	negativ	negativ
Respiratory Syncytial Virus B	negativ	negativ
Rhinovirus Type 5	negativ	negativ
Rotavirus G1 [P8]	negativ	negativ
SARS-CoV-2	negativ	negativ

Tabelle 11: Eluierte RNA/DNA von bakteriellen und viralen Krankheitserregern, die zur Bestimmung der analytischen Spezifität des MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-time RT-PCR Kits getestet. ROX-Kanal (Respiratorisches Synzytialvirus).

<b>Probe</b>	<b>Erwartetes Ergebnis RSV ROX Kanal</b>	<b>MutaPLEX® RespiraSys 1 RSV ROX Kanal</b>
Adenovirus C2	negativ	negativ
Adenovirus 41	negativ	negativ
Bordetella parapertussis	negativ	negativ
Bordetella pertussis	negativ	negativ
Cytomegalievirus	negativ	negativ
Enterovirus Coxsackie B3	negativ	negativ
Emterovirus D68	negativ	negativ
Epstein-Barr Virus	negativ	negativ
Coronavirus OC43	negativ	negativ
Coronavirus NL63	negativ	negativ
Human Herpesvirus 6	negativ	negativ
Influenza Virus A H1N1	negativ	negativ
Influenza Virus A H3N2	negativ	negativ
Influenza Virus A H5N1	negativ	negativ
Influenza Virus B	negativ	negativ
Human Coronavirus MERS-CoV	negativ	negativ
Metapneumovirus Type A1	negativ	negativ
Metapneumovirus Type A2	negativ	negativ
Staphylococcus aureus (MRSA)	negativ	negativ
Mycobacterium tuberculosis complex	negativ	negativ
Mycoplasma pneumoniae	negativ	negativ
Parainfluenza Type 1	negativ	negativ

<b>Probe</b>	<b>Erwartetes Ergebnis RSV ROX Kanal</b>	<b>MutaPLEX® RespiraSys 1 RSV ROX Kanal</b>
Parainfluenza Type 2	negativ	negativ
Parainfluenza Type 3	negativ	negativ
Parainfluenza Type 4	negativ	negativ
Parechovirus 3	negativ	negativ
Pneumocystis jirovecii	negativ	negativ
Respiratory Syncytial Virus A	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
Respiratory Syncytial Virus B	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
Rhinovirus Type 5	negativ	negativ
Rotavirus G1 [P8]	negativ	negativ
SARS-CoV-2	negativ	negativ

Tabelle 12: Inklusion der Primer und Sonden des MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR-Kit (*in-silico*-Analyse).

<b>12–5 000 komplette Genom Sequenzen</b>			<b>Homologie</b>	<b>Kommentar</b>
NCBI / GISAID	RSV	Forward Primer	12 Sequenzen: 100 %	kein Mismatch
		Reverse Primer	2 Sequenzen: 100 %	10 Sequenzen: 96 % (1 Mismatch)
		Probe	10 Sequenzen: 100 %	2 Sequenzen: 96 % (1 Mismatch)
NCBI / GISAID	Flu B	Forward Primer	1 000 Sequenzen: 100 %	kein Mismatch
		Reverse Primer	1 000 Sequenzen: 100 %	kein Mismatch
		Probe	998 Sequenzen: 100 %	2 Sequenzen: 96 % (1 Mismatch)
NCBI / GISAID	Flu A	Forward Primer	5 000 Sequenzen: 100 %	kein Mismatch
		Reverse Primer	5 000 Sequenzen: 100 %	kein Mismatch
		Probe	5 000 Sequenzen: 100 %	kein Mismatch



### 16.3 Linearer Bereich

Der lineare Bereich des r MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR-Kits wurde durch Analyse logarithmischer Verdünnungsreihen, von *in-vitro* Transkripten der Zielsequenzen mit beiden thermischen Profilen, bewertet.

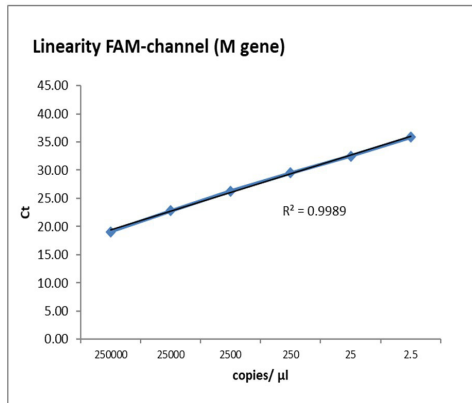


Abbildung 3: Bestimmung des linearen Bereichs des MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR-Kits für das Influenza A Virus im FAM-Kanal.

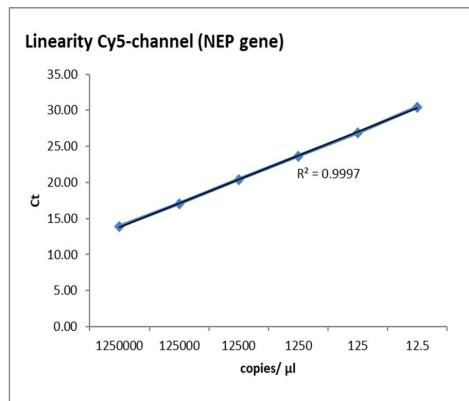


Abbildung 4: Bestimmung des linearen Bereichs des MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR-Kits für das Influenza B Virus im Cy5-Kanal.

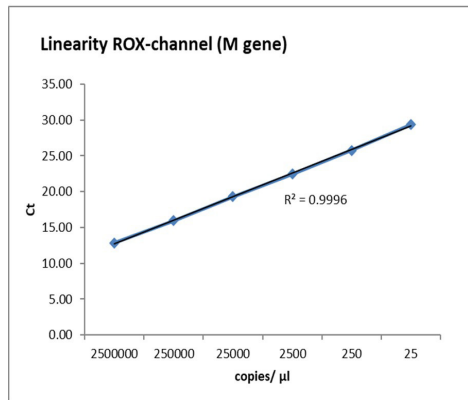


Abbildung 5: Bestimmung des linearen Bereichs des MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR-Kits für das Respiratorisches Synzytial Virus im ROX-Kanal.

## 16.4 Präzision

Die Präzision des MutaPLEX® RespiraSys 1 Real-Time-RT-PCR Kits wurde als Intra-Assay-Variabilität, Inter-Assay-Variabilität und Inter-Lot-Variabilität bestimmt.

Die Variabilitätsdaten werden durch Standardabweichung und Variationskoeffizient ausgedrückt. Die Daten basieren auf Quantifizierungsanalysen definierter Konzentrationen eines Influenza-A-Virus-*in-vitro*-Transkripts, eines Influenza-B-Virus-*in-vitro*-Transkripts, eines Respiratory-Syncytial-Virus-*in-vitro*-Transkripts und auf dem Schwellenwertzyklus der Kontroll-RNA (IPC). Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Präzision des MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR Kits

Influenza A Virus (FAM)	Kopien / μl	Standard Abweichung	Abweichungskoeffizient [%]
Intra-Assay Variability	25	0,24	0,74
Inter-Assay-Variability	25	0,78	2,36
Inter-Lot-Variability	25	0,67	2,03
Influenza B Virus (Cy5)	Kopien / μl	Standard Abweichung	Abweichungskoeffizient [%]
Intra-Assay Variability	12,5	0,32	1,05
Inter-Assay-Variability	12,5	0,08	0,26
Inter-Lot-Variability	12,5	0,13	0,44














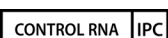

<b>Respiratory Syncytial Virus (ROX)</b>	<b>Kopien / <math>\mu</math>l</b>	<b>Standard Abweichung</b>	<b>Abweichungskoeffizient [%]</b>
Intra-Assay-Variability	2,5	0,28	0,85
Inter-Assay-Variability	2,5	0,23	0,71
Inter-Lot-Variability	2,5	0,17	0,53
<b>IPC (HEX)</b>	<b>Kopien / <math>\mu</math>l</b>	<b>Standard Abweichung</b>	<b>Abweichungskoeffizient [%]</b>
Intra-Assay-Variability	250	0,49	1,86
Inter-Assay-Variability	250	0,59	2,19
Inter-Lot-Variability	250	0,59	2,23

### 16.5 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität von Real-time RT-PCRs hängt hauptsächlich von der DNA/RNA-Extraktionsmethode ab, die zur Isolierung von DNA und RNA aus verschiedenen biologischen Proben verwendet wird. Die benötigten DNA/RNA-Extraktionsreagenzien sind **nicht** Bestandteil des MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR Kits. Diese enthalten jedoch eine Extraktionskontrolle und Richtlinien zur Validierung der Extrakte in jeder Reaktion. Die Extraktionskontrolle zeigt eine Hemmung der Real-Time (RT-)PCR und/oder eine ineffiziente Nukleinsäureextraktion an. Sie kann jedoch nicht als Kalibrator verwendet werden.

Daher garantiert die Immundiagnostik AG die analytischen Sensitivitäten und Spezifitäten der Real-time RT-PCR Kits, die mit eluierter DNA und RNA aus Referenzmaterialien und Ringversuchsproben sowie mit synthetischen Nukleinsäurefragmenten durchgeführt werden. Die Immundiagnostik AG garantiert keine diagnostischen Sensitivitäten. Wenn in Immundiagnostik Arbeitsanleitungen von Real-time RT-PCR Kits diagnostische Sensitivitäten erwähnt werden, beziehen sich die Daten ausschließlich auf eine bestimmte Nukleinsäure-Extraktionsmethode, die bei der Validierung der jeweiligen Kits verwendet wurde, und können nicht auf andere Extraktionsmethoden übertragen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die für die DNA/RNA-Isolierung aus biologischen Proben verwendeten Extraktionsmethoden zu qualifizieren.

## 17 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

cDNA	komplementäre Desoxyribonuk- leinsäure		Katalognummer
PCR	Polymerase- Kettenreaktion		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
RNA	Ribonukleinsäure		Obere Temperatur- grenze
RT	Reverse Transkrip- tion		Hersteller
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus		Verwendbar bis JJJJ-MM-TT
	Enzym		Chargennummer
	Reaktionsmix		Inhalt
	Positive Kontrolle		Arbeitsanleitung beachten
	Negative Kontrolle		<i>In-vitro</i> - Diagnostikum
	Kontroll-RNA (IPC)		European Conformity

## 18 LITERATUR

1. Lothar Thomas, Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 8. Auflage, 2012, TH-Books, ISBN-10: 3980521583

# MutaPLEX® RespiraSys 1

## real time RT-PCR kit

*Test for the in-vitro detection of the RNA of Influenza A virus,  
Influenza B virus and Respiratory Syncytial Virus  
extracted from biological specimens*

Valid from 2021-11-03



**KG198432**  
**KG198496**



**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>28</b>
<b>2</b>	<b>PATHOGEN INFORMATION</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>PACKAGE CONTENTS</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY</b>	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>WARNINGS AND PRECAUTIONS</b>	<b>30</b>
<b>8</b>	<b>SAMPLE MATERIAL</b>	<b>31</b>
<b>9</b>	<b>SAMPLE PREPARATION</b>	<b>31</b>
<b>10</b>	<b>CONTROL RNA</b>	<b>31</b>
<b>11</b>	<b>REAL TIME RT-PCR</b>	<b>32</b>
	11.1 <i>Important points before starting:</i>	32
	11.2 <i>Procedure</i>	32
	11.3 <i>Instrument settings</i>	33
<b>12</b>	<b>DATA ANALYSIS</b>	<b>35</b>
<b>13</b>	<b>ASSAY VALIDATION</b>	<b>37</b>
<b>14</b>	<b>LIMITATIONS OF THE METHOD</b>	<b>37</b>
<b>15</b>	<b>TROUBLESHOOTING</b>	<b>38</b>
<b>16</b>	<b>KIT PERFORMANCE</b>	<b>40</b>
	16.1 <i>Analytical Sensitivity</i>	40
	16.2 <i>Analytical Specificity</i>	40
	16.3 <i>Linear Range</i>	49
	16.4 <i>Precision</i>	50
	16.5 <i>Diagnostic Sensitivity</i>	51
<b>17</b>	<b>ABBREVIATIONS AND SYMBOLS</b>	<b>51</b>
<b>18</b>	<b>LITERATURE</b>	<b>52</b>

## 1 INTENDED USE

The MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit is an assay for the simultaneous detection of RNA of Influenza A Virus, Influenza B Virus and RSV, extracted from biological specimens.

## 2 PATHOGEN INFORMATION

Influenza viruses belong to the family of Orthomyxoviridae and are the causative agent of 'the flu'. Influenza A and B viruses have a single stranded RNA genome, consisting of 8 RNA segments. The genome of Influenza A Viruses is characterized by a high mutation frequency, the so-called 'antigenic drift'. Numerous subtypes of Influenza A Viruses are known. They can be categorized by their surface antigens H (haemagglutinin) and N (neuraminidase): Influenza A (H1N1) Virus, Influenza A (H5N1) Virus etc. Therefore, yearly *in silico* analysis of the sequences of newly emerged subtypes is done, to prevent false negative results caused by primer and/or probe mismatches.

Respiratory Syncytial Viruses are enveloped negative-sense, single stranded RNA Viruses of the Paramyxoviridae family. RSV is a member of the subfamily Pneumovirinae, genus Pneumovirus. RSV are divided into subgroups A and B. RSV is a virus that causes infections of the lungs and respiratory tract. It's so common that most children have been infected with the virus by age 2. RSV can also infect adults.

In adults and older, healthy children, the symptoms of RSV infections are mild and typically mimic the common cold. Self-care measures are usually all that's needed to relieve any discomfort. Infection with RSV can be severe in some cases, especially in premature babies and infants with underlying health conditions. RSV can also become serious in older adults, adults with heart and lung diseases, or anyone with a very weak immune system (immunocompromised).

## 3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit contains specific primers and dual-labeled probes for the amplification of the RNA (cDNA) of Influenza A Virus (M gene, FAM channel), RSV (M gene, ROX channel) and Influenza B Virus (NEP gene, Cy5 channel) extracted from biological specimens.

Furthermore, the MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit contains a Control RNA (Internal Process Control, IPC), which is added during RNA extraction and detected in the same reaction by a HEX-labeled probe.

The Control RNA allows the detection of RT-PCR inhibition and acts as control, that the nucleic acid was isolated from the biological specimen.

## 4 PACKAGE CONTENTS

The reagents supplied are sufficient for 32 (KG198432) or 96 (KG198496) reactions, respectively.

Table 1: Components of the MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit.

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Reaction Mix	yellow	1 x 442 µl	1 x 1325 µl
Enzyme	blue	1 x 6.4 µl	1 x 19.2 µl
Positive control <i>Influenza A, Influenza B, RSV</i>	red	1 x 50 µl	1 x 150 µl
Negative control	green	1 x 50 µl	1 x 150 µl
Control RNA	colourless	1 x 160 µl	1 x 480 µl

## 5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- RNA isolation kit (e.g. MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, 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 or optical reaction plate with optical foil
- Optional: Liquid handling system for automation

\* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

## 6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit is shipped on dry ice or cool packs. All components must be stored at maximum -20°C in the dark immediately after receipt. Do not use reagents after the date of expiry printed on the package. Up to 20 freeze and thaw cycles are possible. For convenience, opened reagents can be stored at +2–8°C for up to 6 months.

Protect kit components from direct sunlight during the complete test run.



## 7 WARNINGS AND PRECAUTIONS

Read the Instructions for Use carefully before using the product.

Before first use check the product and its components for:

- Use of this product is limited to personnel specially instructed and trained in the techniques of real time PCR procedures.
- Specimens should always be treated as infectious and/or biohazardous in accordance with safe laboratory procedures.
- Avoid microbial and nuclease (DNase/RNase) contamination of the eluates and the components of the kit.
- Always use DNase/RNase-free disposable pipette tips with aerosol barriers.
- Always wear protective disposable powder-free gloves when handling kit components.
- Use separated and segregated working areas for (1) sample preparation, (2) reaction setup and (3) amplification/detection activities. The workflow in the laboratory should proceed in unidirectional manner. Always wear disposable gloves in each area and change them before entering a different area.
- Dedicate supplies and equipment to the separate working areas and do not move them from one area to another.
- Store positive and/or potentially positive material separated from all other components of the kit.
- Do not open the reaction tubes/plates post amplification to avoid contamination with amplicons.
- Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state and/or federal regulations or accrediting organizations.
- Do not autoclave reaction tubes after the PCR, since this will not degrade the amplified nucleic acid and will bear the risk to contaminate the laboratory area.
- Discard sample and assay waste according to your local safety regulations.
- Do not combine MutaPLEX® RespiraSys 1 components of different lot numbers.

## 8 SAMPLE MATERIAL

Starting material for MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR is RNA isolated from biological specimens (respiratory samples).

## 9 SAMPLE PREPARATION

Commercial kits for RNA isolation such as MutaCLEAN® Mag RNA/DNA (KG1024) are recommended.

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 10, Control RNA'**

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

## 10 CONTROL RNA

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

Add 5 µl Control RNA per extraction (5 µl x (N+1)). Mix well. Perform the RNA isolation according to the manufacturer's instructions.

**The Control RNA must be added to the Lysis Buffer of the extraction kit.**

## 11 REAL TIME RT-PCR

### 11.1 *Important points before starting:*

- Please pay attention to the chapter 7, 'Warnings and Precautions'.
- 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 (except the Enzyme) and centrifuged very briefly.
- Due to the high viscosity of the Enzyme (blue lid), prewarming at room temperature for 15 min is recommended.

## 11.2 Procedure

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

Volume per reaction	Volume master mix
13.8 µl Reaction Mix	13.8 µl x (N+1)
0.2 µl Enzyme	0.2 µl x (N+1)

### 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 / take an optical PCR reaction plate.
- Pipet **14 µl** of the Master Mix into each optical PCR reaction tube / the optical PCR reaction plate.
- Add **6 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 / the optical PCR reaction plate (Table 3).
- Close the optical PCR reaction tubes / the optical PCR reaction plate immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

Table 3: Preparation of the real time PCR

Component	Volume
Master mix	14.0 µl
Sample	6.0 µl
Total volume	20.0 µl

### 11.3 Instrument settings

For the real time RT-PCR, use the thermal profile shown in table 4.

Table 4: real time RT-PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	No of cycles
Reverse Transcription	10 min	45 °C	1
Initial Denaturation	5 min	95 °C	1
Amplification of cDNA			45 Aquisition at the end of this step
Denaturation	10 s	95 °C	
Annealing and Extension	40 s	60 °C	

Dependent on the real time instrument used, further instrument settings have to be adjusted according to table 5.

Table 5: Overview of the instrument settings required for the MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR.

Real time RT-PCR Instrument	Parameter	Detection Channel	Notes		
LightCycler 480II			Color compensation kit MutaPLEX® CC CoV-2 (KG19-4-CC) required		
			Melt factor	Quant factor	Max integration time [sec]
	Influenza A Virus	465–510	1	10	1
	Control RNA (IPC)	533–580	1	10	2
	RSV	533–610	1	10	2
Influenza B Virus	618–660	1	10	3	
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	Influenza A Virus	FAM	Gain 8	Reference Dye: None	
	Control RNA (IPC)	HEX	Gain 1		
	RSV	ROX	Gain 1		
	Influenza B Virus	Cy5	Gain 4		
AriaMx QuantStudio 5 Bio-Rad CFX96 Bio-Rad CFX Opus 96	Influenza A Virus	FAM	Reference Dye: None		
	Control RNA (IPC)	HEX			
	RSV	ROX			
	Influenza B Virus	Cy5			

<b>Real time RT-PCR Instrument</b>	<b>Parameter</b>	<b>Detection Channel</b>	<b>Notes</b>	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	Influenza A Virus Control RNA (IPC) RSV Influenza B Virus	Green Yellow Orange Red	Gain 5 Gain 5 Gain 5 Gain 5	Outlier Removal NTC Threshold 15%
Mic qPCR Cycler	Influenza A Virus Control RNA (IPC) RSV Influenza B Virus	Green Yellow Orange Red	Gain 8 Gain 10 Gain 10 Gain 10	

## 12 DATA ANALYSIS

The following results can occur:

Signal/C <sub>T</sub> Values				Interpretation
FAM Channel Influenza A Virus	Cy5 Channel Influenza B Virus	ROX Channel RSV	HEX Channel Control RNA (IPC)	
<b>positive</b>	negative	negative	positive or negative <sup>1</sup>	<b>Positive result, the sample contains Influenza A RNA.</b>
negative	<b>positive</b>	negative	positive or negative <sup>1</sup>	<b>Positive result, the sample contains Influenza B RNA.</b>
negative	negative	<b>positive</b>	positive or negative <sup>1</sup>	<b>Positive result, the sample contains Respiratory Syncytial Virus RNA.</b>
negative	negative	negative	≤ 34 <sup>2</sup>	<b>Negative result, the sample contains neither Influenza A Virus, Influenza B Virus nor Respiratory Syncytial Virus RNA.</b>
negative	negative	negative	negative or > 34 <sup>2</sup>	<b>Caution!</b> The real time RT-PCR is either inhibited or errors occurred while RNA/DNA extraction.

<sup>1</sup> A strong positive signal in the FAM, Cy5 or ROX channel can inhibit the IPC. In such cases the result for the Control RNA can be neglected.

<sup>2</sup> In case of high C<sub>T</sub> values, the IPC should be compared to the water extraction control as described in the chapter 13 'Assay validation'.

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

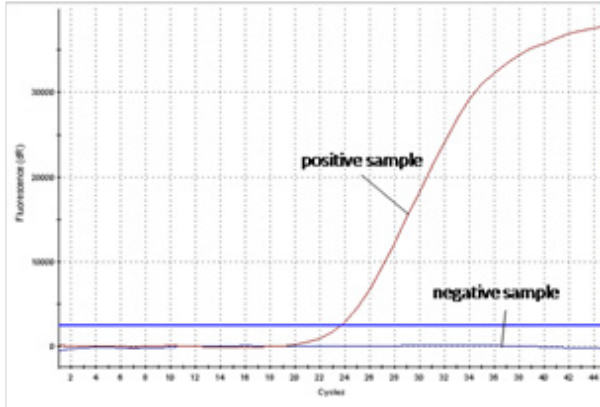


Figure 1: The positive sample shows virus-specific amplification in the FAM channel, whereas no fluorescence signal is detected in the negative sample.

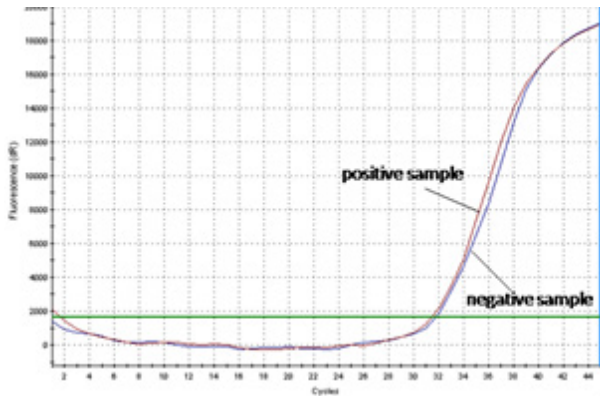


Figure 2: The positive sample and the negative sample show a signal in the Control RNA specific HEX channel (IPC). The amplification signal of the Control RNA in the negative sample shows that the missing signals in the pathogen specific channels FAM, Cy5 and ROX are not due to RT-PCR inhibition or failure of RNA isolation, but that the sample is a true negative sample.

## 13 ASSAY VALIDATION

### Negative controls

The Negative Control must show no  $C_t$  in the FAM, Cy5, ROX and HEX channel.

### Positive controls

The Positive Control must show a positive (i.e. exponential) amplification curve in the different channels FAM, Cy5 and ROX. The Positive Control must fall below  $C_T$  30.

### Internal controls

The following values for the amplification of the internal control are valid using Imundiagnostik AG nucleic acid extraction kits MutaCLEAN Mag RNA/DNA (KG1024). The Control RNA (IPC) must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The Control RNA must fall below a  $C_T$  of 34. If the Control RNA is above  $C_T$  34 this points to a purification problem or a strong positive sample that can inhibit the IPC. In the latter case, the assay is valid. It is recommended to perform the extraction of a water control in each run. The IPC in the water control must fall below a  $C_T$  of 34.

If other nucleic acid extraction kits are used, the customer must define own cutoffs. In this case the  $C_T$  value of the Control RNA (IPC) in an eluate from a sample should not be delayed for more than 4  $C_T$  in comparison to an eluate from an extracted water control.

## 14 LIMITATIONS OF THE METHOD

- Strict compliance with the instruction for use is required for optimal results.
- Use of this product is limited to personnel specially instructed and trained in the techniques of real time PCR and in vitro diagnostic procedures.
- Good laboratory practice (GLP) is essential for proper performance of this assay.
- All reagents should be closely monitored for impurity and contamination. Any suspicious reagents should be discarded.
- This assay must not be used on a biological specimen directly. Appropriate nucleic acid extraction methods have to be conducted prior to using this assay.
- The presence of RT-PCR inhibitors may cause false negative or invalid results.
- As with any diagnostic test, results of the MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit need to be interpreted in consideration of all clinical and laboratory findings.



## 15 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a real time RT-PCR. If you have further questions, please do not hesitate to contact Immundiagnostik AG directly.

### **No fluorescence signal in the FAM, ROX and Cy5 channel of the positive control**

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

Select the FAM channel for analysis of the Influenza A Virus specific amplification, the ROX channel for analysis of the RSV specific amplification and the Cy5 channel for analysis of the Influenza B Virus specific amplification.

Select the HEX channel for the amplification of the Control RNA.

#### ***Incorrect preparation of the Master Mix***

Make sure, the Enzyme is added to the Master Mix (chapter 11 'Real time RT-PCR').

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

Check your work steps and compare with chapter 11.2 'Procedure'.

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

Compare the thermal profile with the protocol in chapter 11.3 'Instrument Settings'.

#### ***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 6 'Transport, Storage and Stability'.

### **Weak or no signal of the control RNA and simultaneous absence of a signal in the virus-specific FAM, ROX or Cy5 channel**

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

Check the real time RT-PCR conditions in chapter 11 'Real time RT-PCR'.

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

Make sure that you use an appropriate isolation method (chapter 9 'Sample Preparation') and follow the manufacturer's instructions. Make sure that the ethanol-containing washing buffers have been completely removed.

***sample material not sufficient***

Make sure that enough sample material has been applied to the extraction. Use an appropriate isolation method (chapter 9 'Sample Preparation') and follow the manufacturer's instructions.

***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 6, 'Transport, Storage and Stability'.

**Detection of a fluorescence signal in the FAM and/or ROX and/or Cy5 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.

## 16 KIT PERFORMANCE

### 16.1 Analytical Sensitivity

The limit of detection (LoD) of the MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit was determined using serial dilutions of synthetic RNA-fragments containing the specific gene target sequence on a Stratagene Mx3005P real time PCR instrument.

The LoD of the MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit for Influenza A Virus is <2.5 genome copies per  $\mu\text{l}$ , for Respiratory Syncytial Virus is <0.25 genome copies per  $\mu\text{l}$  and for Influenza B Virus <0.125 genome copies per  $\mu\text{l}$ .

The sensitivity of the MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit was also analysed by testing round robin samples of known status.

### 16.2 Analytical Specificity

The specificity of the MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit was evaluated with different ring trial samples of known status and different other relevant viruses and bacteria found in clinical samples and basing on in silico analyses.

All ring trial samples were detected correctly. Results are shown in Table 6, Table 7 and Table 8.

The results for the sample analysis are shown in Table 9, Table 10 and Table 11. The results for the in silico analysis are shown in Table 12.

Table 6: Ring trial samples tested for the validation of the sensitivity of the MutaPLEX® RespiSys 1 real time RT-PCR kit. Results for Influenza A Virus, FAM channel

<b>Ring trial samples with known status</b>	<b>Ring trial</b>	<b>Expected Result Influenza A Virus FAM channel</b>	<b>MutaPLEX® RespiSys 1 Influenza A Virus FAM channel</b>
RESPIplus21S-01	QCMD 2021: Respiratory I Plus RESPIplus-21S	negative	negative
RESPIplus21S-02		negative	negative
RESPIplus21S-03		<b>positive</b>	<b>positive</b>
RESPIplus21S-04		negative	negative
RESPIplus21S-05		negative	negative
RESPIplus21S-06		<b>positive</b>	<b>positive</b>
RESPIplus21S-07		<b>positive</b>	<b>positive</b>
RESPIplus21S-08		negative	negative
RESPIplus21S-09		negative	negative
RESPIplus21S-10		negative	negative
432017	Instand: June 2021: Respiratory Virus- panel 2 for Multiplex Tests	<b>positive</b>	<b>positive</b>
432018		<b>positive</b>	<b>positive</b>
432019		negative	negative
432020		negative	negative
431017	Instand: June 2021: Respi- ratory Viruspanel 1 for Multiplex Tests	<b>positive</b>	<b>positive</b>
431018		negative	negative
431019		negative	negative
431020		negative	negative

Table 7: Ring trial samples tested for the validation of the sensitivity of the MutaPLEX® RespiSys 1 real time RT-PCR kit. Results for Influenza B Virus, Cy5 channel.

Ring trial samples with known status	Ring trial	Expected Result Influenza B Virus Cy5 channel	MutaPLEX® RespiSys 1 Influenza B Virus Cy5 channel
RESPIplus21S-01	QCMD 2021: Respiratory I Plus RESPIplus-21S	negative	negative
RESPIplus21S-02		<b>positive</b>	<b>positive</b>
RESPIplus21S-03		negative	negative
RESPIplus21S-04		negative	negative
RESPIplus21S-05		negative	negative
RESPIplus21S-06		negative	negative
RESPIplus21S-07		negative	negative
RESPIplus21S-08		negative	negative
RESPIplus21S-09		<b>positive</b>	<b>positive</b>
RESPIplus21S-10		negative	negative
432017	Instand: June 2021: Respiratory Virus- panel 2 for Multiplex Tests	negative	negative
432018		negative	negative
432019		<b>positive</b>	<b>positive</b>
432020		negative	negative
431017	Instand: June 2021: Respiratory Viruspanel 1 for Multiplex Tests	negative	negative
431018		<b>positive</b>	<b>positive</b>
431019		negative	negative
431020		negative	negative

Table 8: Ring trial samples tested for the validation of the sensitivity of the MutaPLEX® RespiSys 1 real time RT-PCR kit. Results for Respiratory Syncytial Virus, ROX channel.

<b>Ring trial samples with known status</b>	<b>Ring trial</b>	<b>Expected Result RSV ROX channel</b>	<b>MutaPLEX® RespiSys 1 RSV ROX channel</b>
RESPIplus21S-01	QCMD 2021: Respiratory I Plus RESPIplus-21S	negative	negative
RESPIplus21S-02		negative	negative
RESPIplus21S-03		negative	negative
RESPIplus21S-04		<b>positive</b>	<b>positive</b>
RESPIplus21S-05		negative	negative
RESPIplus21S-06		negative	negative
RESPIplus21S-07		negative	negative
RESPIplus21S-08		negative	negative
RESPIplus21S-09		negative	negative
RESPIplus21S-10		<b>positive</b>	<b>positive</b>
432017	Instand: June 2021: Respiratory Virus- panel 2 for Multiplex Tests	<b>positive</b>	<b>positive</b>
432018		negative	negative
432019		<b>positive</b>	<b>positive</b>
432020		negative	negative
431017	Instand: June 2021: Respiratory Virus- panel 1 for Multiplex Tests	<b>positive</b>	<b>positive</b>
431018		negative	negative
431019		negative	negative
431020		negative	negative

Table 9: Eluted RNA/DNA from bacterial and viral pathogens tested for the determination of the analytical specificity of MutaPLEX® RespiSys 1 real time RT-PCR kit. FAM channel (Influenza A Virus).

Sample	Expected Result Influenza A Virus FAM channel	MutaPLEX® RespiSys 1 Influenza A Virus FAM channel
Adenovirus C2	negative	negative
Adenovirus 41	negative	negative
Bordetella parapertussis	negative	negative
Bordetella pertussis	negative	negative
Cytomegalievirus	negative	negative
Enterovirus Coxsackie B3	negative	negative
Emterovirus D68	negative	negative
Epstein-Barr Virus	negative	negative
Coronavirus OC43	negative	negative
Coronavirus NL63	negative	negative
Human Herpesvirus 6	negative	negative
Influenza Virus A H1N1	<b>positive</b>	<b>positive</b>
Influenza Virus A H3N2	<b>positive</b>	<b>positive</b>
Influenza Virus A H5N1	<b>positive</b>	<b>positive</b>
Influenza Virus B	negative	negative
Human Coronavirus MERS-CoV	negative	negative
Metapneumovirus Type A1	negative	negative
Metapneumovirus Type A2	negative	negative
Staphylococcus aureus (MRSA)	negative	negative
Mycobacterium tuberculosis complex	negative	negative
Mycoplasma pneumoniae	negative	negative

<b>Sample</b>	<b>Expected Result Influenza A Virus FAM channel</b>	<b>MutaPLEX® RespiSys 1 Influenza A Virus FAM channel</b>
Parainfluenza Type 1	negative	negative
Parainfluenza Type 2	negative	negative
Parainfluenza Type 3	negative	negative
Parainfluenza Type 4	negative	negative
Parechovirus 3	negative	negative
Pneumocystis jirovecii	negative	negative
Respiratory Syncytial Virus A	negative	negative
Respiratory Syncytial Virus B	negative	negative
Rhinovirus Type 5	negative	negative
Rotavirus G1 [P8]	negative	negative
SARS-CoV-2	negative	negative

Table 10: Eluted RNA/DNA from bacterial and viral pathogens tested for the determination of the analytical specificity of MutaPLEX® RespiSys 1 real time RT-PCR kit. Cy5 channel (Influenza B Virus).

<b>Sample</b>	<b>Expected Result Influenza B Virus Cy5 channel</b>	<b>MutaPLEX® RespiSys 1 Influenza B Virus Cy5 channel</b>
Adenovirus C2	negative	negative
Adenovirus 41	negative	negative
Bordetella parapertussis	negative	negative
Bordetella pertussis	negative	negative
Cytomegalievirus	negative	negative
Enterovirus Coxsackie B3	negative	negative
Emterovirus D68	negative	negative
Epstein-Barr Virus	negative	negative
Coronavirus OC43	negative	negative
Coronavirus NL63	negative	negative



Sample	Expected Result Influenza B Virus Cy5 channel	MutaPLEX® RespiSys 1 Influenza B Virus Cy5 channel
Human Herpesvirus 6	negative	negative
Influenza Virus A H1N1	negative	negative
Influenza Virus A H3N2	negative	negative
Influenza Virus A H5N1	negative	negative
Influenza Virus B	<b>positive</b>	<b>positive</b>
Human Coronavirus MERS-CoV	negative	negative
Metapneumovirus Type A1	negative	negative
Metapneumovirus Type A2	negative	negative
Staphylococcus aureus (MRSA)	negative	negative
Mycobacterium tuberculosis complex	negative	negative
Mycoplasma pneumoniae	negative	negative
Parainfluenza Type 1	negative	negative
Parainfluenza Type 2	negative	negative
Parainfluenza Type 3	negative	negative
Parainfluenza Type 4	negative	negative
Parechovirus 3	negative	negative
Pneumocystis jirovecii	negative	negative
Respiratory Syncytial Virus A	negative	negative
Respiratory Syncytial Virus B	negative	negative
Rhinovirus Type 5	negative	negative
Rotavirus G1 [P8]	negative	negative
SARS-CoV-2	negative	negative

Table 11: Eluted RNA/DNA from bacterial and viral pathogens tested for the determination of the analytical specificity of MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit. ROX channel (Respiratory Syncytial Virus).

<b>Sample</b>	<b>Expected Result RSV ROX channel</b>	<b>MutaPLEX® RespiraSys 1 RSV ROX channel</b>
Adenovirus C2	negative	negative
Adenovirus 41	negative	negative
Bordetella parapertussis	negative	negative
Bordetella pertussis	negative	negative
Cytomegalievirus	negative	negative
Enterovirus Coxsackie B3	negative	negative
Emterovirus D68	negative	negative
Epstein-Barr Virus	negative	negative
Coronavirus OC43	negative	negative
Coronavirus NL63	negative	negative
Human Herpesvirus 6	negative	negative
Influenza Virus A H1N1	negative	negative
Influenza Virus A H3N2	negative	negative
Influenza Virus A H5N1	negative	negative
Influenza Virus B	negative	negative
Human Coronavirus MERS-CoV	negative	negative
Metapneumovirus Type A1	negative	negative
Metapneumovirus Type A2	negative	negative
Staphylococcus aureus (MRSA)	negative	negative
Mycobacterium tuberculosis complex	negative	negative
Mycoplasma pneumoniae	negative	negative

Sample	Expected Result RSV ROX channel	MutaPLEX® RespiraSys 1 RSV ROX channel
Parainfluenza Type 1	negative	negative
Parainfluenza Type 2	negative	negative
Parainfluenza Type 3	negative	negative
Parainfluenza Type 4	negative	negative
Parechovirus 3	negative	negative
Pneumocystis jirovecii	negative	negative
Respiratory Syncytial Virus A	<b>positive</b>	<b>positive</b>
Respiratory Syncytial Virus B	<b>positive</b>	<b>positive</b>
Rhinovirus Type 5	negative	negative
Rotavirus G1 [P8]	negative	negative
SARS-CoV-2	negative	negative

Table 12: Inclusivity of the MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit Primers and Probes (*in silico* analysis).

12–5 000 whole genome sequences		Homology	Comment
NCBI / GISAID	RSV	Forward Primer	12 sequences: 100%
		Reverse Primer	2 sequences: 100%
		Probe	10 sequences: 100%
NCBI / GISAID	Flu B	Forward Primer	1 000 sequences: 100%
		Reverse Primer	1 000 sequences: 100%
		Probe	998 sequences: 100%
NCBI / GISAID	Flu A	Forward Primer	5 000 sequences: 100%
		Reverse Primer	5 000 sequences: 100%
		Probe	5 000 sequences: 100%

### 16.3 Linear Range

The linear range of the MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit was evaluated by analysing logarithmic dilution series of *in vitro* transcripts of the target sequences with both thermal profiles.

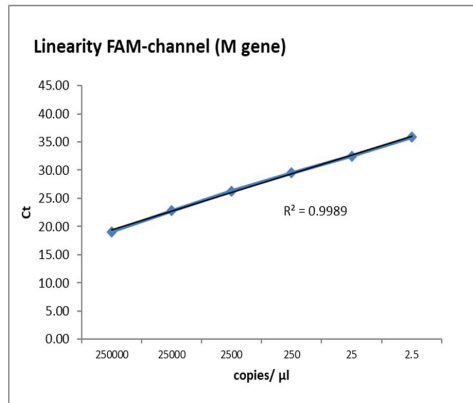


Figure 3: Determination of the linear range of the MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit for Influenza A Virus in the FAM channel

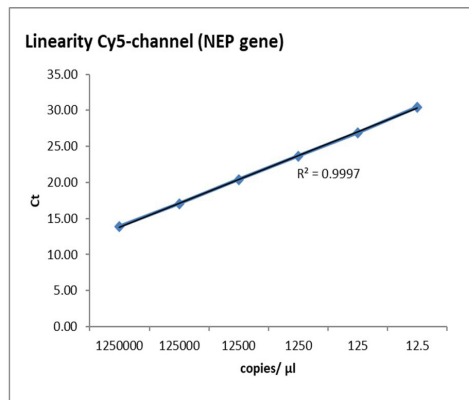


Figure 4: Determination of the linear range of the MutaPLEX® RespiraSys 1 real time RT-PCR kit for Influenza B Virus in the Cy5 channel

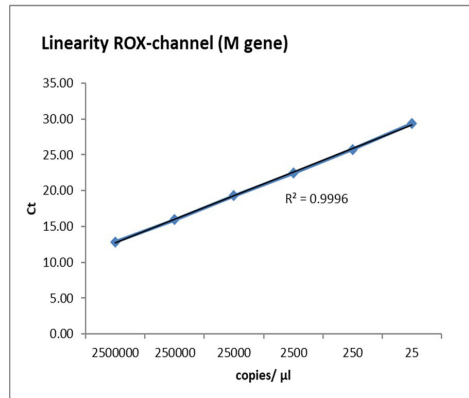


Figure 5: Determination of the linear range of the MutaPLEX® RespiSys 1 real time RT-PCR kit for Respiratory Syncytial Virus in the ROX channel

## 16.4 Precision

The precision of the MutaPLEX® RespiSys 1 real time RT-PCR kit was determined as intra-assay variability, inter-assay variability and inter-lot variability.

Variability data are expressed by standard deviation and coefficient of variation. The data are based on quantification analyses of defined concentrations of an Influenza A Virus in vitro transcript, an Influenza B Virus in vitro transcript, a Respiratory Syncytial Virus in vitro transcript and on the threshold cycle of the Control RNA (IPC). The results are shown in Table 13.

Table 13: Precision of the MutaPLEX® RespiSys 1 real time RT-PCR kit

Influenza A Virus (FAM)	copies/ μl	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]
Intra-Assay Variability	25	0.24	0.74
Inter-Assay-Variability	25	0.78	2.36
Inter-Lot-Variability	25	0.67	2.03
Influenza B Virus (Cy5)	copies/ μl	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]
Intra-Assay Variability	12.5	0.32	1.05
Inter-Assay-Variability	12.5	0.08	0.26
Inter-Lot-Variability	12.5	0.13	0.44

<b>Respiratory Syncytial Virus (ROX)</b>	<b>copies/ µl</b>	<b>Standard Deviation</b>	<b>Coefficient of Variation [%]</b>
Intra-Assay-Variability	2.5	0.28	0.85
Inter-Assay-Variability	2.5	0.23	0.71
Inter-Lot-Variability	2.5	0.17	0.53
<b>IPC (HEX)</b>	<b>copies/ µl</b>	<b>Standard Deviation</b>	<b>Coefficient of Variation [%]</b>
Intra-Assay-Variability	250	0.49	1.86
Inter-Assay-Variability	250	0.59	2.19
Inter-Lot-Variability	250	0.59	2.23





## 16.5 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity of real time (RT-)PCR assays is mainly dependent on the DNA/RNA extraction method used to isolate DNA and RNA from various biological specimens. DNA/RNA extraction reagents are not part of the Immundiagnostik AG real time (RT-)PCR kits. Immundiagnostik AG real time (RT-)PCR kits include an extraction control and guidelines for the validation criteria of the extraction control in each reaction. The extraction control indicates inhibition of the real time (RT-)PCR and/or inefficient nucleic acid extraction. It cannot be used as a calibrator.

Therefore, Immundiagnostik AG guarantees the analytical sensitivities and specificities of the real time (RT-)PCR kits, performed with eluted DNA and RNA from reference materials and ring trial samples and with synthetic nucleic acid fragments. Immundiagnostik AG does not guarantee diagnostic sensitivities. If diagnostic sensitivities are mentioned in manuals of Immundiagnostik AG real time (RT-)PCR kits, the data are strictly correlated to a specific nucleic acid extraction method that has been used during the validation of the respective kits and cannot be transferred to other extraction methods. It is the responsibility of the user to qualify the extraction methods used for DNA/RNA isolation from biological samples.

## 17 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

cDNA	complementary Deoxyribonucleid Acid		Catalog number
PCR	Polymerase Chain Reaction		Contains sufficient for <n> test

RNA	Ribonucleid Acid		Upper limit of temperature
RT	Reverse Transcription		Manufacturer
RSV	Respiratory Syncytial Virus		Use by YYYY-MM-DD
<b>ENZYME</b>	Enzyme	<b>LOT</b>	Lot number
<b>REACTION MIX</b>	Reaction mix	<b>CONTENT</b>	Content
<b>CONTROL</b> +	Positive Control		Consult instructions for use
<b>CONTROL</b> -	Negative Control	<b>IVD</b>	<i>In-vitro</i> diagnostic medical device
<b>CONTROL RNA</b>   <b>IPC</b>	Control RNA (IPC)	<b>CE</b>	European Conformity

## 18 LITERATURE

1. Lothar Thomas, Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 8. Auflage, 2012, TH-Books, ISBN-10: 3980521583

## **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)

